

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ALESSANDRA APARECIDA VIREQUE

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO IN VITRO DE OÓCITOS BOVINOS  
MATURADOS EM SISTEMA DE MIV QUIMICAMENTE DEFINIDO COM  
MACROMOLÉCULAS SINTÉTICAS

Ribeirão Preto

2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

ALESSANDRA APARECIDA VIREQUE

Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos maturados em sistema de MIV quimicamente definido com macromoléculas sintéticas

Tese de doutorado apresentada no curso de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Biologia da Reprodução  
Orientador: Professor Doutor Rui Alberto Ferriani

Ribeirão Preto

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Vireque, Alessandra Aparecida

Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos maturados em sistema de MIV quimicamente definido com macromoléculas sintéticas. RIBEIRÃO PRETO, 2008.

125.p.:il;30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Área de concentração: Biologia da Reprodução.

Orientador: Ferriani, Rui Alberto

1. Oócito. 2. Maturação *in vitro*. 3. Meio quimicamente definido. 4. PIV. 5. hsp-70 e bax. 6. apoptose

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alessandra Aparecida Vireque

Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos maturados em sistema de MIV quimicamente definido com macromoléculas sintéticas

Tese de doutorado apresentada À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor.  
Área de concentração: Biologia da Reprodução

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a).: \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a).: \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a).: \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a).: \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a).: \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIAS

*Dedico este trabalho à minha família, a base de tudo.*

*Ao Anderson, com quem dividi as conquistas e intempéries do caminho. Foram muitos os ínterins e os desafios. Mas, ao olhar para o lado, você estava lá.*

*Obrigada por tudo.*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao Prof. Dr. Marcos Felipe Silva de Sá pela confiança, incentivo e apoio inestimável. Toda a minha gratidão, admiração e respeito.

Ao Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani. O aprendizado foi proporcional ao desafio. Agradeço pela orientação, confiança e suporte em todos os momentos do desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia pela oportunidade de dar continuidade às atividades iniciadas na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto durante o mestrado e o apoio no doutoramento.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida.

Ao Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo – Embrapa CNPGL, que nos anos de convivência, contribuiu para meu crescimento científico e intelectual. Agradeço pela confiança, apoio e amizade.

À Profa. Dra. Alzira Amélia Martins Rosa e Silva. Muito além do enorme conhecimento científico, agradeço pela confiança, carinho e ensinamentos de vida.

À Dra. Yeda Fumie Watanabe – Vitrogen – por ter se colocado à disposição. Agradeço pela atenção e apoio durante a montagem do laboratório, parceria e amizade.

Ao Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles – FZEA/USP Pirassununga – pela acessibilidade, apoio e as valiosas sugestões na reformulação do projeto de pesquisa.

Ao Dr. Wanderley Ferreira de Sá – Embrapa CNPGL – pelos conselhos de pai, as oportunidades de treinamento e capacitação no Laboratório de Reprodução Animal e pela amizade.

Ao Dr. João Pedro Caetano Junqueira – Mater Dei/BH – pela disposição e colaboração nas correções da tese.

À Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis pela confiança, apoio e parceria.

À Profa. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva pelas orientações na correção da proforma, atenção e amizade.

À Profa. Dra. Paula de Albuquerque Salles Navarro pelas sugestões ao projeto de pesquisa e pela participação.



À Elisa Melo Ferreira pela participação na montagem do laboratório e na realização dos experimentos. Foram dias de “sala de FIV”, experimentos bons outros nem tanto. Embriões lindos outros degenerados... Conseguimos vencer mais uma etapa da vida. Meu carinho, respeito e admiração.

À Raquel Varella Serapião pelo suporte na realização das avaliações de expressão gênica, pela sua alegria contagiante, parceria e amizade.

À Lígia pelo treinamento da técnica de TUNEL, apoio e disposição.

Ao Dr. Wellington de Paula Martins pela colaboração nas análises estatísticas, sugestões para as publicações e pela amizade.

À Luciana Ochuiuto Teixeira de Resende pelo carinho, dedicação e amizade.

À Maria Albina Verceze Bortolheiro pelas dosagens hormonais, suporte durante a montagem do laboratório, a convivência próxima e amizade.

À Central de Esterilização de Materiais – HCFMRP/USP – pelo preparo do material para pesquisa.

Ao CEMB – HCFMRP/USP – pela assistência técnica e manutenção de equipamentos do laboratório de FIV experimental.

Ao Frigorífico Barra Mansa – Sertãozinho/SP pelo fornecimento dos ovários bovinos.

À Agrogenética por colocar à disposição o laboratório para a utilização do aparelho de PCR em tempo real.

À Vitrogen pela assistência técnica durante a realização dos experimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para realização do projeto.

## **Epígrafe**

*“... Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve...  
A vida é muito para ser insignificante.”*

*Charles Chaplin*

*“... O caminho da vida pode ser o da liberdade e da beleza, porém nos extraviamos.*

*A cobiça envenou a alma dos homens... Levantou no mundo as muralhas do ódio...  
E tem-nos feito marchar a passo de ganso para a miséria e morticínios.*

*Criamos a época da velocidade, mas nos sentimos enclausurados dentro dela.  
A máquina, que produz abundância, tem-nos deixado em penúria.*

*Nossos conhecimentos fizeram-nos céticos; nossa inteligência, empedernidos e cruéis.  
Pensamos em demasia e sentimos bem pouco.*

*Mais do que de máquinas, precisamos de humanidade. Mais do que de inteligência,  
precisamos de afeição e doçura. Sem essas virtudes, a vida será de violência e tudo será  
perdido... ”*

Charles Chaplin (O Último Discurso – O Grande Ditador)

*“... O corpo vivo, embora necessite do ambiente que o circunda, é, apesar disso, relativamente independente do mesmo. Esta independência do organismo com relação ao seu ambiente externo deriva do fato de que, nos seres vivos, os tecidos são, de fato, removidos das influências externas diretas, e são protegidos por um verdadeiro ambiente interno, que é constituído, particularmente, pelos fluidos que circulam no corpo...”*

Claude Bernard

Fisiologista (1813-1878)

## SUMÁRIO

|   |            |
|---|------------|
| <b>LISTA DE TABELAS .....</b>                                     | <b>i</b>   |
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>                                     | <b>ii</b>  |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>                        | <b>iii</b> |
| <b>RESUMO .....</b>   | <b>iv</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>   | <b>v</b>   |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>1</b>   |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>                             | <b>3</b>   |
| 2.1. Potencial do oócito para o desenvolvimento embrionário ..... | 3          |
| 2.2. O complexo cumulus-oócito .....                              | 6          |
| 2.2.1. Expansão do cumulus.....                                   | 7          |
| 2.2.2. Esteroidogênese .....                                      | 9          |
| 2.3. Qualidade embrionária .....                                  | 11         |
| 2.3.1. Expressão gênica.....                                      | 12         |
| 2.3.1.1. Gene Hsp-70 .....  | 14         |
| 2.3.1.2. Gene Bax.....  | 16         |
| 2.3.2. Morte celular .....  | 16         |
| 2.3.3. Apoptose .....   | 17         |
| 2.3.3.1. Vias apoptóticas .....                                   | 19         |
| 2.3.3.2. Apoptose em oócitos.....                                 | 21         |
| 2.3.3.3. Apoptose em embriões.....                                | 23         |
| 2.4. Sistemas de maturação in vitro .....                         | 26         |
| 2.4.1. Meio TCM-199 .....   | 26         |
| 2.4.2. Meio $\alpha$ -MEM .....                                   | 27         |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.4.3. Suplementos .....   | 28        |
| 2.4.3.1. Soro e proteínas.....   | 28        |
| 2.4.3.2. Hormônios e fatores de crescimento .....                          | 30        |
| 2.4.3.3. Macromoléculas sintéticas .....                                   | 32        |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>   | <b>34</b> |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>  | <b>35</b> |
| 4.1- Colheita e manipulação dos ovários para a aspiração folicular .....   | 35        |
| 4.2- Aspiração e seleção dos Complexos Cumulus-Oócito (COCs).....          | 35        |
| 4.2.1- Maturção in vitro .....   | 36        |
| 4.3. Fecundação in vitro e desenvolvimento embrionário precoce.....        | 36        |
| 4.3.1- Preparação Espermática.....   | 36        |
| 4.3.2. Inseminação in vitro.....   | 37        |
| 4.3.3. Cultivo dos zigotos e avaliação do desenvolvimento embrionário..... | 37        |
| 4.4 - Dosagens Hormonais .....   | 38        |
| 4.5- Expressão Gênica.....   | 38        |
| 4.5.1- Primers.....  | 38        |
| 4.5.2- Extração e amplificação do RNA .....                                | 39        |
| 4.5.3- Análise da expressão dos genes HSP-70 e BAX.....                    | 39        |
| 4.6- Apoptose .....  | 40        |
| 4.6.1. Técnica de TUNEL .....  | 41        |
| 4.6.2. Fixação dos blastocistos.....                                       | 41        |
| 4.6.3. Permeabilização .....   | 41        |
| 4.6.4. Incubação com DNase.....  | 41        |
| 4.6.5. Reação de TUNEL .....   | 42        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.6.6. Coloração – Hoescht .....  | 42        |
| 4.6.7. Avaliação dos embriões .....   | 42        |
| 4.7. Delineamento experimental .....  | 43        |
| 4.7.1. Experimento 1: Desenvolvimento embrionário in vitro de oócitos bovinos maturados em meio quimicamente definido com PVA.....  | 43        |
| 4.7.2. Experimento 2: Substituição do PVA por PVP-40 no sistema de maturação in vitro quimicamente definido para a produção in vitro de embriões (PIV).....   | 43        |
| 4.7.3 Experimento 3: Produção de estradiol e progesterona por complexos cumulus-oócito bovinos durante a MIV em meio quimicamente definido com PVA ou PVP-40 .....  | 44        |
| 4.7.4. Experimento 4: Expressão dos genes Hsp-70 e Bax nos embriões produzidos em sistema de maturação in vitro quimicamente definido por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real – PCR Real Time ..... | 44        |
| 4.7.5. Experimento 5: Índice de fragmentação internucleossômica do DNA das células embrionárias dos embriões produzidos em sistema de maturação in vitro quimicamente definido .....  | 45        |
| 4.8. Análise estatística.....   | 46        |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>   | <b>47</b> |
| 5.1. Experimentos 1 e 2.....  | 47        |
| 5.2. Experimento 3 .....  | 48        |
| 5.3. Experimento 4 .....  | 51        |
| 5.4. Experimento 5 .....  | 56        |
| <b>6. DISCUSSÃO.....</b>  | <b>58</b> |
| <b>7. CONCLUSÕES.....</b>   | <b>67</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>68</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ANEXOS</b> .....   | <b>84</b> |
| <b>Manuscrito 1:</b> Preimplantation development and expression of Hsp-70 and Bax genes in bovine embryos derived from oocytes matured in $\alpha$ -MEM medium supplemented with growth factors and synthetic macromolecules..... | 84        |
| <b>Manuscrito 2:</b> Developmental capacity and steroidogenesis during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes cultured in MEM-alpha medium supplemented with PVA or PVP-40 .....                                  | 103       |



## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> - Seqüência, temperatura de anelamento e tamanho do fragmento de primers. PCR-Real Time.....                                  | 40 |
| <b>Tabela 2</b> - Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos maturados in vitro em meio $\alpha$ -MEM suplementado com PVA ou PVP-40..... | 47 |
| <b>Tabela 3</b> - Produção de estradiol e progesterona (ng/ml/24h) por complexos cumulus-oócito maturados em meio quimicamente definido ..... | 49 |
| <b>Tabela 4</b> - Índice apoptótico e número total de células de embriões produzidos in vitro em sistema de MIV quimicamente definido.....    | 56 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> - Cascata apoptótica em células de mamíferos (adaptado de Hansen, 2001)..  | 20 |
| <b>Figura 2</b> - Estrutura química do álcool polivinílico e da polivinilpirrolidona-40.....   | 32 |
| <b>Figura 3</b> - Blastocistos bovinos produzidos in vitro derivados de COCs maturados em meio $\alpha$ -MEM suplementado com PVP-40 .....   | 48 |
| <b>Figura 4</b> - Concentração de estradiol (pg/ml) em diferentes meios de cultura nos tempos 0h e 24h de maturação in vitro de complexos cumulus-oócito bovinos.....  | 50 |
| <b>Figura 5</b> - Concentração de progesterona (ng/ml) em diferentes meios de cultura após 24 horas de maturação in vitro de complexos cumulus-oócito bovinos .....  | 50 |
| <b>Figura 6</b> - Eletroforese em gel de agarose de transcritos dos genes H2a (176pb), Hsp-70 (275pb) e Bax (174pb) .....  | 51 |
| <b>Figura 7</b> - Expressão relativa de transcritos específicos (média ; EP) em blastocistos bovinos produzidos in vitro a partir de oócitos maturados em diferentes sistemas de cultura: TCM-199 e a $\alpha$ - MEM, suplementado com PVA ou PVP-40 ..... | 52 |
| <b>Figura 8</b> - Curvas de dissociação e amplificação do gene H2a.....  | 53 |
| <b>Figura 9</b> - Curvas de dissociação e amplificação do gene Hsp-70.....   | 54 |
| <b>Figura 10</b> - Curvas de dissociação e amplificação do gene Bax.....   | 55 |
| <b>Figura 11</b> - Detecção de fragmentação internucleossômica do DNA pela técnica de TUNEL em blastocisto bovino eclodido (D8) .....  | 56 |
| <b>Figura 12</b> - Detecção de fragmentação internucleossômica do DNA pela técnica de TUNEL em blastocistos bovinos eclodidos no D8 do cultivo .....   | 57 |

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- APAF – fator ativador de apoptose
- ATP – trifosfato de adenosina
- Be – blastocisto eclodido
- BSA – albumina sérica bovina
- fafBSA – albumina sérica bovina livre de ácidos graxos
- Bx – blastocisto expandido
- CC – células do cumulus
- CG – célula da granulosa
- CIV – cultivo in vitro
- COC – complexo cumulus-oócito
- E2 – estradiol
- FIV – fecundação in vitro
- FSH – hormônio folículo estimulante
- HSP-70 – proteína do choque térmico
- IGF-I – fator de crescimento semelhante à insulina
- LH – hormônio luteinizante MIV = maturação in vitro
- MCI – massa celular interna
- $\alpha$ -MEM – minimum essential medium-alpha
- P4 – progesterona
- PCR – reação em cadeia da polimerase
- PFD – paraformoldeído
- PIV – produção in vitro
- PVA – álcool polivinílico
- PVP-40 – polivinilpirrolidona 40
- SFB – soro fetal bovino
- SOF – fluido sintético do oviduto
- SSS – substituto sintético de soro
- SVE – soro de vaca em estro
- TCM-199 – meio de cultura tecidual 199
- TE – trofocitoderma
- TUNEL – Terminal deoxynucleotidyl transferase Uracil Nick End Labeling

## RESUMO

Vireque, A.A. **Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos maturados em sistema de MIV quimicamente definido com macromoléculas sintéticas.** 2008. 125 p. Tese – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A procura por condições de cultura mais adequadas e menos variáveis que simulem o ambiente *in vivo* têm levado ao desenvolvimento de meios de cultura definidos, com menor impacto sobre a reprogramação molecular de oócitos e embriões. Complexos cumulus-oócito bovinos foram cultivados em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com IGF-1 e insulina, e 0.1% PVA ou 0.1% PVP. Não foram usados FSH e/ou LH em ambos os tratamentos. O grupo controle consistiu de COCs maturados em TCM com FSH e 10% de soro de vaca em estro. Após a fertilização, os prováveis zigotos foram co-cultivados com células do cumulus até 224 h pós-inseminação (hpi). A produção de esteroides foi mensurada no meio de cultura após a maturação *in vitro* (MIV) e a atividade de aromatase das células do cumulus (CC) foi estimada pela avaliação da proporção de estradiol (E2) e progesterona (P4). As taxas de clivagem, blastocisto e eclosão foram avaliadas 168-224 horas hpi. Em adição, o RNA total foi isolado de pools de embriões, reversamente transcrito em cDNA, e a expressão relativa dos transcritos dos genes Hsp-70 e Bax foram analisados pelo PCR em tempo real e os índices de células apoptóticas em blastocistos eclodidos foram determinados pela reação de TUNEL. Foi detectada elevada atividade de aromatase (E2:P4 ratio > 1.0) no meio de cultura dos sistemas de MIV quimicamente definidos. A taxa de clivagem foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo controle (68,3%) que nos grupos PVA (54,4%) e PVP-40 (58,3%). Entretanto, não houve diferença ( $P > 0,05$ ) nas taxas de blastocistos (40%; 44.6% and 42.6%) e eclosão (36%; 34.62% and 40.8%) entre os grupos PVA, PVP-40 e controle, respectivamente. Similarmente, não foi detectada diferença ( $P > 0,05$ ) na expressão relativa dos transcritos Hsp-70 e Bax no PVA e PVP-40 em comparação com o calibrador (grupo controle). Não foram observadas diferenças significativas nos índices de núcleos TUNEL positivos entre os blastocistos derivados dos três grupos. Estes resultados indicam que as CC de COCs cultivados em meio suplementado com soro durante a MIV tem reduzida atividade de aromatase e que oócitos bovinos podem ser maturados em meio livre de soro e gonadotrofina, suplementado com IGF-I, insulina e PVA ou PVP sem alterar o desenvolvimento pós-clivagem, a expressão de genes associados ao estresse e o índice apoptótico dos embriões.

**Palavras-chave:** oócito bovino; meio de MIV definido; PVA; PVP-40; esteroidogênese; desenvolvimento embrionário; Hsp-70; Bax; apoptose.

## ABSTRACT

Vireque, A.A. ***In vitro* embryonic development of bovine oocytes matured in chemically defined IVM system with synthetic macromolecules.** 2008. 125p. Tese – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

The search for better and less variable culture conditions simulating the *in vivo* environment has led to the development of defined culture media, with lower impact on the molecular reprogramming of oocytes and embryos. Bovine cumulus-oocyte complexes (COC) were cultured in  $\alpha$ -MEM medium supplemented with IGF-1 and insulin, and 0.1% PVA or 0.1% PVP. Neither FSH nor LH was used in the two treatments. The control group consisted of COCs matured in TCM plus FSH and 10% estrous cow serum. After fertilization, presumptive zygotes were co-cultured with cumulus cells until 224 h post insemination (hpi). Steroid production was measured in culture medium after *in vitro* maturation (IVM) and cumulus cell (CC) aromatase activity was estimated by evaluating the ratio of estradiol (E2) to progesterone (P4). Cleavage, blastocyst and hatching rates were evaluated 168-224 hours hpi. In addition, total RNA was isolated from pooled embryos, reverse transcribed into cDNA and subjected to transcript analysis by real-time PCR, the relative expression of Hsp-70 and Bax was evaluated and apoptotic cell indices in hatched blastocysts were determined by the TUNEL assay. Elevated aromatase activity (E2:P4 ratio > 1.0) was detected in culture medium of chemically defined IVM systems. Cleavage rate was higher ( $P < 0.05$ ) for the control group (68.3%) than for the PVA (54.4%) and PVP-40 (58.3%) groups. Nevertheless, there was no difference ( $P > 0.05$ ) in blastocyst (40%; 44.6% and 42.6%) or hatching (36%; 34.62% and 40.8%) rates between the PVA, PVP-40 and control groups. Similarly, no difference ( $P > 0.05$ ) was detected in relative expression of Hsp-70 and Bax transcripts for PVA, PVP-40 in comparison to the calibrator group (control group). No significant differences in TUNEL positive nucleus indices were observed between blastocysts derived from the three groups. These results indicate that CC of COCs cultured in medium supplemented with serum during IVM have decreased aromatase activity and that bovine oocytes can be matured in serum- and gonadotrophin-free medium supplemented with PVA or PVP without altering post-cleavage development or the relative expression of some genes associated with stress and the rate of embryo apoptosis.

**Key words:** bovine oocyte; IVM defined medium; PVA; PVP-40; steroidogenesis; embryonic development; Hsp-70; Bax; apoptosis.

## 1. INTRODUÇÃO

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

A produção *in vitro* de embriões (PIV) envolve as etapas de captação, maturação (MIV) e fecundação (FIV) de oócitos e o cultivo de embriões (CIV). É uma biotécnica de amplo potencial de aplicação para as espécies humana e animal e de grande expressividade tanto para a ciência básica quanto para a aplicada. Apesar dos avanços científicos alcançados nesta área nos últimos anos, o controle exógeno da maturação oocitária ainda constitui um fator limitante na tecnologia de embriões, especialmente nas espécies humana, eqüina e suína, em função dos protocolos de MIV normalmente empregados e da inconsistência dos resultados obtidos, referentes às taxas e qualidade de mórulas e blastocistos. Nos procedimentos *in vitro*, as condições de cultura interferem de modo decisivo no destino do embrião. A sobrevivência embrionária é determinada, em parte, pela MIV e afetada diretamente pelo cultivo pós-fertilização.

Os sistemas de maturação *in vitro* desenvolvidos e testados nos últimos 20 anos contribuíram para o aumento na qualidade do embrião, porém falharam em alcançar maiores índices de produção (SIRARD, 2001). Substâncias orgânicas de alto peso molecular como o álcool polivinílico (PVA) e a polivinilpirrolidona (PVP) têm sido utilizadas como substitutos do soro nos meios de cultura. A suplementação

hormonal na MIV, incluindo gonadotrofinas, fatores de crescimento e esteróides, também tem sido investigada e revista. A supressão do soro e a introdução de macromoléculas sintéticas nos meios de cultura têm sido uma tentativa de eliminar os aditivos biológicos incompletamente definidos do meio de cultura, tornando possível uma avaliação mais precisa dos efeitos dos protocolos experimentais na maturação oocitária e o estabelecimento de sistemas de MIV mais fisiológicos (SIRARD; COENEN, 1993; AKTAS et al., 2003; ALI et al., 2004; PAVLOK et al., 2005; RUSSELL et al., 2006; THOMPSON, 2006; COLEMAN et al., 2007).

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

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Potencial do oócito para o desenvolvimento embrionário

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

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

A segregação incorreta dos cromossomos é uma causa já documentada da incompetência dos oócitos. A análise de YADAV et al. (1991) mostrou que cerca de 15% dos oócitos cultivados apresentam anormalidades cromossômicas (4,2% aneuplóides e 10,7% diplóides) e interrompem seu desenvolvimento no período de pré-implantação. A incidência de anormalidades cromossômicas é maior em



embriões produzidos por fertilização *in vitro* (VIUFF et al., 2001) em comparação à situação *in vivo* e algumas causas de defeitos cromossômicos que são expressos em decorrência das condições de cultura não ocorrem *in vivo*. O cultivo pode causar profundas mudanças na expressão gênica e função do oócito e embrião (DURANTHON; RENARD, 2001).

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

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

Até atingir cerca de 110 a 120  $\mu\text{m}$  de diâmetro, em um folículo de aproximadamente 2 a 3 mm, o oócito participa ativamente da síntese, empacotamento e armazenamento de RNAm que será utilizado pelo embrião em desenvolvimento. Apesar de grande parte do RNAm materno pré-reservado se

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

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

Vários fatores atuam sobre o oócito imaturo a fim de torná-lo hábil para a fecundação e a produção de um embrião viável. A maturação inadequada do núcleo ou do citoplasma, ou a falta de sincronia entre os dois processos maturacionais pode

inviabilizar a fecundação, aumentar as ocorrências de polispermia, de partenogênese ou bloqueio embrionário (BLONDIN et al., 1997).

## 2.2. O complexo cumulus-oócito

Em mamíferos, o oócito presente no folículo de *De Graaf* é envolto por várias camadas de células compactas referidas como células do cumulus (CC). As CC são consideradas um subtipo das CG e mantêm algumas das características fenotípicas das CG murais, incluindo receptores para gonadotrofinas e síntese de esteróides (GORDON, 1994). O oócito e as CC são metabolicamente interligados pelas junções *Gap* (JG), possibilitando a entrada de diversos metabólitos no citoplasma oocitário (MOOR et al., 1990). As junções gap são canais transmembrana formados por hexâmeros de proteínas pertencentes à família das conexinas (Cx) (LOEWENSTEIN, 1987). Moléculas menores que 1000 daltons podem passar através destes canais, dirigindo-se do citoplasma de uma célula à outra célula vizinha. Segundo THOMAS et al. (2004) no momento da punção de folículos entre 3 a 8 mm, 100% das JG entre o oócito e as CC estão íntegras. Este valor decresce chegando a aproximadamente 18% após 21 horas de maturação *in vitro*.

Tem sido estabelecido que as CC suportam a maturação do oócito até o estágio de metáfase II e regulam a maturação citoplasmática. Diversos estudos indicam que oócitos desnudos murinos (BINOR; WOLF, 1979), ovinos (MAGNUSSON et al., 1980) e bovinos (CHIAN et al., 1994) podem alcançar a maturação meiótica *in vitro*. No entanto, a competência para o desenvolvimento de oócitos desnudos é significativamente inferior aos CCOs (KIM et al., 1997). As

células do cumulus permanecem conectadas ao oócito durante o curso da maturação e não apenas secretam ou transmitem fatores que estimulam efetivamente a maturação do citoplasma, mas desempenham funções importantes para a viabilidade e sobrevivência do oócito. AS CC são responsáveis pela transmissão de moléculas ao oócito como o AMPc (adenosina monofosfato cíclica) e conseqüente bloqueio meiótico e pela glicólise e produção de piruvato, o principal substrato energético utilizado pelo oócito. As CC também protegem o oócito de danos causados por estresse oxidativo, sintetizando durante a maturação *in vitro*, entre vários fatores, a glutathiona (GSH), um tripeptídeo anti-oxidante que participa de inúmeras reações para eliminar os radicais livres das células. TATEMOTO et al. (2000) reportam que COCs bovinos são menos sensíveis aos sinais apoptóticos induzidos por estresse oxidativo durante a MIV que oócitos desnudos. O estradiol secretado pelo COC também pode desempenhar uma função essencial nesta situação, já que há evidências que o estradiol inibe a apoptose induzida por estresse oxidativo em tecidos ovarianos (MURDOCH, 1988).

### **2.2.1. Expansão do cumulus**

Durante o período pré-ovulatório as CC perdem o contato entre si e com o oócito, porém a integridade do complexo cumulus-oócito é mantida pela deposição de uma matriz mucoelástica, rica em ácido hialurônico, secretada pelas CC. Proteínas derivadas do soro e sintetizadas pelas CC são requeridas para organizar e manter estáveis os polímeros adjacentes de hialuronato, como um gel altamente estruturado (D'ALESSANDRIS et al., 2001). A formação desta matriz promove um aumento

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

A expansão do cumulus também é acompanhada por modificações das junções *gap* nas CC. Células do cumulus bovinas e murinas expressam as conexinas 32 e 43 (SUTOVSKY et al., 1993; VALDIMARSSON et al., 1993). Em CC de porcas e ratas o início da retomada da meiose está associada com a redução dos níveis da Cx43 (GRAZUL-BILSKA et al., 1997; SHIMADA et al., 2001). MARCHAL et al. (2003) demonstraram uma correlação positiva entre a retomada da meiose e redução da Cx43 nas JG de CC eqüinas com modificação no balanço entre as formas fosforiladas e não-fosforiladas das moléculas de conexina durante a maturação do CCO. Da mesma forma, análises por imunofluorescência de CCOs bovinos mostram que durante a MIV as junções *gap* Cx43-positivas desaparecem enquanto a Cx32 torna-se detectável (SUTOVSKY et al., 1993).

O processo de expansão do cumulus está associado aos mecanismos de extrusão e transporte do oócito na trompa uterina e com a modulação do acesso do espermatozóide ao oócito durante a fertilização (CHERR et al., 1990; CHEN et al., 1993). Embora seja um processo fisiológico facilmente reproduzido *in vitro*, o significado funcional da expansão do cumulus durante a MIV ainda não está totalmente elucidado e há dúvidas e controvérsias acerca da importância deste processo na maturação citoplasmática e aquisição de competência do oócito para o desenvolvimento (CHOI et al., 2001; ALI; SIRARD, 2002).

### **2.2.2. Esteroidogênese**

O processo de síntese dos hormônios esteróides (estrógenos, progestágenos e andrógenos) é dependente do aporte de colesterol e ocorre no

interior das mitocôndrias e retículo endoplasmático das células esteroidogênicas foliculares (ADASHI, 1996). Considera-se atualmente que um dos passos limitantes no processo de esteroidogênese seja determinado pela StAR (proteína da regulação aguda da esteroidogênese), a qual realiza o transporte do colesterol da membrana externa para a membrana interna da mitocôndria (STOCCO, 1997). A via biossintética da esteroidogênese tem início com a enzima P450-scc (P450-*side-chain-cleavage*) que transforma o colesterol em pregnenolona, clivando sua cadeia lateral C-27 para C-21. A pregnenolona formada pode, então, seguir duas vias, a via  $\delta$ -4 (delta-4) e a via  $\delta$ -5 (delta-5). Pela via  $\delta$ -4, a pregnenolona será convertida em P4 pela enzima 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ - hidroxisteróide desidrogenase), que por sua vez será convertida em 17 $\alpha$ -OH-progesterona pela ação da enzima 17 $\alpha$ -hidroxilase, sendo em seguida transformada em androstenediona, via 17-20-liase. A ligação do LH ao seu receptor nas células tecais estimula a atividade da 17 $\alpha$ -hidroxilase, que está presente somente nestas células (BAO et al., 1997). Pela via  $\delta$ -5 será formada a DHEA (dihidroepiandrostenediona) mediante ações da enzima 17 $\alpha$ -hidroxilase, que transforma a pregnenolona em 17 $\alpha$ -OH-pregnenolona e da 17-20-liase que converte esse último produto em DHEA. Mediante ação da 3 $\beta$ -HSD, a DHEA é convertida em androstenediona que, posteriormente será transformada em testosterona, por ação da 17 $\beta$ -HSD (GORE-LANGTON, 1994). Finalmente, a testosterona, por ação da P450 aromatase, será convertida em estradiol nas células da granulosa.

A esteroidogênese de CCOs durante a MIV tem sido avaliada por vários autores (MINGOTI et al., 2002; SCHOENFELDER et al., 2003; THOMPSON, 2006; WANG et al., 2006). Estudos recentes indicam que o CCO atua na esteroidogênese folicular (VANDERHYDEN et al., 1993; SCHOENFELDER et al.,

2003) e que a esteroidogênese do CCO contribui para a qualidade do embrião (OTSUKA et al., 2005). No entanto, ainda não está devidamente esclarecido se a atividade ou o perfil esteroidogênico do CCO durante a maturação *in vitro* influencia a competência do oócito para o desenvolvimento embrionário.

### **2.3. Qualidade embrionária**

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

Durante a última década muitos esforços foram reunidos no sentido de aumentar o índice e a qualidade dos embriões produzidos *in vitro*. O principal problema na tecnologia de embriões é a diferença na qualidade entre embriões produzidos *in vitro* e embriões produzidos *in vivo*. Conseqüentemente, métodos mais precisos para a avaliação da qualidade embrionária são de grande importância. O desenvolvimento do oócito em um blastocisto tem sido utilizado como parâmetro para avaliar a competência oocitária, no entanto não traz informações suficientes sobre a qualidade do embrião produzido. A eclosão também tem sido utilizada em



muitos estudos como indicação da competência para o desenvolvimento de blastocistos produzidos *in vitro* (BAVISTER, 1995), sendo um bom indicador da viabilidade do oócito/embrião (CAMARGO et al., 2005). Outros aspectos usados para determinar a competência do oócito para o desenvolvimento incluem avaliações morfológicas dos embriões PIV como o número total de blastômeros ou a proporção entre o número de células da massa celular interna (MCI) e do trofotoderma (TE). Contudo, o teste fundamental da qualidade de um blastocisto é sua capacidade de estabelecer a gestação e gerar um animal saudável (DURANTHON; RENARD, 2001). Na maioria dos estudos, por diversas razões como logística, economia e tempo despendido na pesquisa, métodos alternativos são utilizados para avaliar a qualidade embrionária. A cinética do desenvolvimento embrionário, expressão gênica e apoptose servem como critérios funcionais para inferir sobre a qualidade de embriões produzidos *in vitro* (MAKAREVICH; MARKKULA, 2002).

### **2.3.1. Expressão gênica**

Avaliações dos padrões de expressão gênica em roedores e ruminantes envolvem a análise comparativa de transcritos específicos em oócitos e embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, e entre oócitos/embriões produzidos em diferentes sistemas de maturação e cultura *in vitro* (RUSSELL et al., 2006). Tem sido mostrado que a maturação *in vitro* pode alterar a abundância relativa de transcritos em oócitos bovinos (LONERGAN et al., 2003; HUMBLLOT et al., 2005). Estes estudos compararam os meios de cultura TCM-199 e cSOF e observaram aumento significativo na expressão de vários genes em oócitos maturados em cSOF.

SAGIRKAYA et al. (2007) demonstram que os níveis de transcritos para a *heat shock protein* (hsp-70), *interferon tau* (IF-tau), *DNA methyltransferase 3a* (Dnmt3a), *desmosomal glycoprotein desmocollin III* (DcIII) e o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina II (Igf-2r) foram alterados em diferentes condições durante a MIV de oócitos bovinos em meio suplementado com soro fetal (SFB) ou substituto sintético de soro (SSS). Alterações na expressão de transcritos maternos associadas à suplementação do meio de MIV também foram observadas por outros autores, em oócitos e embriões bovinos. WATSON et al. (2000) reportam que oócitos bovinos maturados em meio desprovido de aminoácidos apresentaram declínio de RNA mensageiros da subunidade  $\alpha 1$  da enzima Na/K-ATPase e da ciclina A. WARZYCH et al. (2007) demonstram elevada frequência de transcritos dos genes IGF1, IGF2 e IGF2R em blastocistos resultantes de oócitos maturados em meio suplementado com fofBSA (BSA livre de ácidos graxos) enquanto a transcrição do gene Hsp-70 foi estimulada pelo soro. Resultados similares foram obtidos por WRENZYCKI et al. (1999). No entanto, há poucos relatos sobre os efeitos dos sistemas de MIV na expressão gênica de embriões em desenvolvimento.

O desenvolvimento pré-implantacional do embrião bovino é regulado pela informação genômica materna acumulada durante a oogênese e depende também dos transcritos derivados da ativação do genoma embrionário (MEMILI; FIRST, 1999; MEIRELLES et al., 2004). A expressão gênica tem importância fundamental na coordenação dos mecanismos homeostáticos e metabólicos durante o desenvolvimento e seu controle preciso durante a fase pré-implantacional é particularmente importante. As etapas iniciais do desenvolvimento, incluindo o tempo em que ocorre a primeira clivagem, ativação do genoma embrionário,

compactação e formação do blastocisto podem ser afetadas pelas condições e meios de cultura. Condições sub-ótimas de cultura durante a maturação *in vitro* e o cultivo embrionário podem resultar em um marcado decréscimo na qualidade dos blastocistos produzidos e afetar a viabilidade do embrião após a transferência, bem como sua capacidade de chegar a termo e se desenvolver em um animal saudável. Procedimentos *in vitro*, tais como a PIV e a clonagem por transferência nuclear somática também têm sido correlacionadas com significativa *up* ou *dowregulation*, indução de novo ou silenciamento de genes críticos para o desenvolvimento fetal e neonatal. Estas alterações são, provavelmente, causadas por modificações epigenéticas, como a metilação do DNA e modificações nas histonas (WRENZYCKI et al., 2005). Alguns estudos demonstram que genes induzidos pelo estresse como o SOX, MnSOD, BAX, IFt, HSP-70 e G6PD são altamente transcritos em embriões produzidos *in vitro*. Por outro lado, genes relacionados com o metabolismo, crescimento e diferenciação (Glut-5, Cx 43, IGF-II e IGF-IR) foram detectados em maior quantidade em embriões produzidos *in vivo* (GUTIERREZ-ADAN et al., 2004). Estes padrões de transcrição refletem a resposta embrionária as condições de cultivo *in vitro* adversas e a plasticidade do desenvolvimento pré-implantacional em condições sub-ótimas, compensadas com o ajuste, pelo embrião, do seu programa de desenvolvimento (NIEMANN; WRENZYCKI, 2000).

#### **2.3.1.1. Gene Hsp-70**

A proteína 70 do choque térmico (HSP-70) parece ser importante para a viabilidade oocitária e o desenvolvimento embrionário. Embora o gene Hsp-70 seja

descrito como um gene constitutivo em embriões, seu nível de expressão está associado à resposta celular ao estresse (LEVY, 2001). Esta proteína está envolvida na resistência celular ao estresse térmico e age protegendo as células expostas à elevação de temperatura, estabilizando a estrutura protéica (GEORGOPOULOS; WELCH, 1993), inibindo a tradução (THULASIRAMAN et al., 1998) e prevenindo a apoptose (LI et al., 1996). A introdução de anticorpos anti HSP-70 em meio de cultura resultou em decréscimo no desenvolvimento de embriões murinos (NEUER et al., 1998) e bovinos (AL-KATANANI; HANSEN, 2002), mesmo na ausência de estresse térmico. Desde que a expressão do gene Hsp-70 é induzida por fatores de estresse, os níveis de transcritos refletem ambos, a resposta celular e a intensidade do estresse (NEUER et al., 2000). Há poucos dados na literatura sobre a expressão deste gene em oócitos bovinos. WRENZYCKI et al. (1999) observaram aumento nos níveis de RNA mensageiro do Hsp-70 em oócitos maturados em meio suplementado com soro em comparação com a suplementação com o PVA. Uma tendência à elevação dos transcritos deste gene foi observada em oócitos maturados na presença de soro ou albumina quando comparados ao PVP-40. Quanto à expressão do Hsp-70 em embriões *in vivo* e *in vitro*, os resultados publicados são inconsistentes. KNIJN et al. (2002) não observaram diferenças, enquanto WRENZYCKI et al. (2001) detectaram aumento nos níveis de transcritos após o cultivo *in vitro*, com variações na abundância relativa de transcritos em embriões cultivados em diferentes meios de cultura (SOF, TCM-199) e com diferentes suplementações (soro, fafBSA, PVA). A abundância relativa de transcritos do gene Hsp-70 também foi significativamente elevada em embriões bovinos criopreservados, pós-descongelamento (PARK et al., 2006).

### 2.3.1.2. Gene Bax

O Bax é um gene pró-apoptótico e sua função está associada à atividade do Bcl-2. A proporção entre as proteínas Bax:Bcl-2 pré-determina a resposta celular a um estímulo apoptótico. Up-regulation do gene Bax em embriões produzidos *in vitro* tem sido descrita em diferentes estudos (RIZOS et al., 2002; LONERGAN, 2005). Contudo, alterações na quantidade relativa de transcritos deste gene tem sido investigada, predominantemente, em embriões PIV, em decorrência das condições do cultivo *in vitro* (CIV) (RIZOS et al., 2002) e não da maturação *in vitro*. Dados sobre a influência da MIV na expressão do gene Bax em embriões bovinos são escassos. WARZYCH et al. (2007) publicaram pela primeira vez dados sobre a expressão deste gene em embriões resultantes de oócitos maturados em diferentes condições de cultura. Todavia, não observaram alterações na abundância relativa de transcritos do Bax em oócitos e blastocistos bovinos eclodidos, após a maturação *in vitro* em meio suplementado com PVP-40, BSA ou SFB. YANG e RAJAMAHENDRAN, (2002) reportam expressão do Bax em oócitos e embriões de diferentes qualidades e maior frequência de transcritos deste gene em oócitos desnudos.

### 2.3.2. Morte celular

Em termos clássicos, necrose e apoptose são dois tipos de morte celular, com aspectos distintos e induzidos por diferentes mecanismos. A apoptose é considerada operacional, morfológica e bioquimicamente distinta da morte celular por necrose (KERR et al., 1972; WYLLIE, 1980). A necrose é induzida por eventos

letais de origem química, biológica ou física. Inversamente, a apoptose depende da regulação gênica de processos biológicos dependentes de energia (reservas de ATP). Sabe-se atualmente que os dois fenômenos podem contribuir para a morte celular de oócitos e embriões, no entanto a morte celular por apoptose aparece com maior frequência, principalmente nas células embrionárias.

### 2.3.3. Apoptose

O termo apoptose (do grego *apo* = separação; *ptosis* = queda) foi introduzido por KERR et al. (1972) para designar a forma fisiológica de morte celular. No nível celular, a apoptose pode ser caracterizada por fragmentação do citoplasma e núcleo, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e fagocitose (HARDY, 1997; MAKAREVICH; MARKKULA, 2002).

Alterações nucleares típicas do estágio inicial da apoptose incluem picnose e condensação da cromatina nas porções adjacentes à membrana nuclear. Finalmente, o núcleo entra em colapso e a cromatina se fragmenta. A clivagem do DNA é um dos eventos terminais da cascata apoptótica, seguida pela segmentação final da célula nos corpos apoptóticos (PEREZ et al., 1999). A análise da degradação do DNA, apesar de não ser universal, é forte evidência de alterações morfológicas reconhecidas durante a apoptose. A formação de fragmentos de DNA de alto peso molecular precede a fragmentação do DNA em oligonucleotídeos e pode ser sinal irreversível da morte celular por apoptose (BROWN et al., 1993; ZHIVOTOVSKY et al., 1994). A quebra do DNA cromossômico é catalisada por endoenzimas dependentes de  $\text{Ca}^+$  e  $\text{Mg}^+$  (KERR et al., 1994) e é decorrente de eventos nucleares

e bioquímicos que resultam na ativação de enzimas proteolíticas, as quais ativam DNases mediadoras da fragmentação internucleossomal do DNA e a lise de substratos específicos de proteínas responsáveis pela integridade e a forma do citoplasma (PULKKI; VOIPIO-PULKKI, 2000). Estas DNases endógenas cortam as regiões internucleossomais em fragmentos de 180 a 200 pares de bases (pb) expondo a extremidade 3' da fita de DNA (PEREZ et al., 1999). A reação de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase Uracil Nick End Labeling*) permite a detecção *in situ* de células apoptóticas por meio da marcação da fragmentação oligossomal do DNA gerada por estas DNases (GAVRIELI et al., 1992).

Há várias famílias de genes envolvidas no processo de apoptose. A família do gene Bcl-2 (B cell leukemia/lymphoma 2) é composta por membros anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-w Bcl-xl, A1 e outros) e por membros pró-apoptóticos (Bax, Bka, Bad, Bcl-xs, Bid, Bik e outros). A ação das proteínas pertencentes à família BCL-2 no processo apoptótico ocorre ao nível dos poros da membrana mitocondrial, permitindo ou não a saída do citocromo C que é um ativador de caspases. As caspases ou cisteíno proteases, mediam a clivagem proteolítica de um grande número de proteínas importantes para a integridade e sobrevivência celular e finalmente ativam as endonucleases responsáveis pela fragmentação do DNA (EXLEY et al., 1999; NAGATA, 2000; SPANOS et al., 2000). Uma vez ativada, a maioria das caspases tem a habilidade de catalisar a ativação de vários outros membros dessa família de proteases, resultando na amplificação da cascata proteolítica (THOMPSON, 1999). A cascata da apoptose pode ser dividida em três estágios sequenciais: (1) estágio de iniciação, que inclui a indução da cascata; (2) estágio de execução, no qual tem início a ativação das caspases efetoras e (3) morte apoptótica

(figura 1), resultante de uma cascata complexa de eventos que levam ao colapso do núcleo e da própria célula, sem a liberação de componentes intracelulares, de forma a evitar a ocorrência de reação inflamatória.

### **2.3.3.1. Vias apoptóticas**

Duas vias, receptor dependente ou receptor independente, podem induzir a apoptose. A via de indução dependente de receptor é ativada pelas interações entre receptores e ligantes específicos, que levam à formação de um complexo de sinalização e subsequentemente ativam a família de caspases iniciadoras. As caspases iniciadoras (caspases 8 e 9) clivam e ativam a segunda subpopulação de caspases, chamadas de caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7). Esta família de caspases é responsável pelos primeiros eventos proteolíticos, com clivagem do citoesqueleto e proteínas relacionadas. A translocação da fosfatidilserina da porção interna para a externa da membrana plasmática também ocorre nos estágios iniciais da apoptose e é determinada pela atividade de enzimas como a translocase. A externalização da fosfatidilserina é usada pela célula como um sinal para eventos como a atração de macrófagos ou indução da cascata de coagulação.

A segunda via de indução da apoptose, receptor independente, pode ser ativada por sinais de estresse intracelular que resultem em disfunção mitocondrial, como lesão do DNA, alterações das vias metabólicas (aumento do cálcio intracelular, redução do pH, estresse oxidativo, drogas, entre outros). Na presença de sinais de estresse intracelular, ocorre a translocação de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 do citoplasma para a mitocôndria, onde induzem a liberação do citocromo-c



presente entre as membranas mitocondriais interna e externa (SMAILI et al., 2003). No citoplasma, o citocromo-c forma um complexo com o fator ativador de apoptose (APAF) levando à ativação de caspases efetoras (figura 1). Ao serem ativadas, as caspases efetoras clivam, diretamente ou por meio de outras proteases, proteínas críticas para a sobrevivência celular. As caspases efetoras ativam o fator da fragmentação do DNA e outras nucleases resultando em fragmentação específica do DNA (LIU et al., 1997).

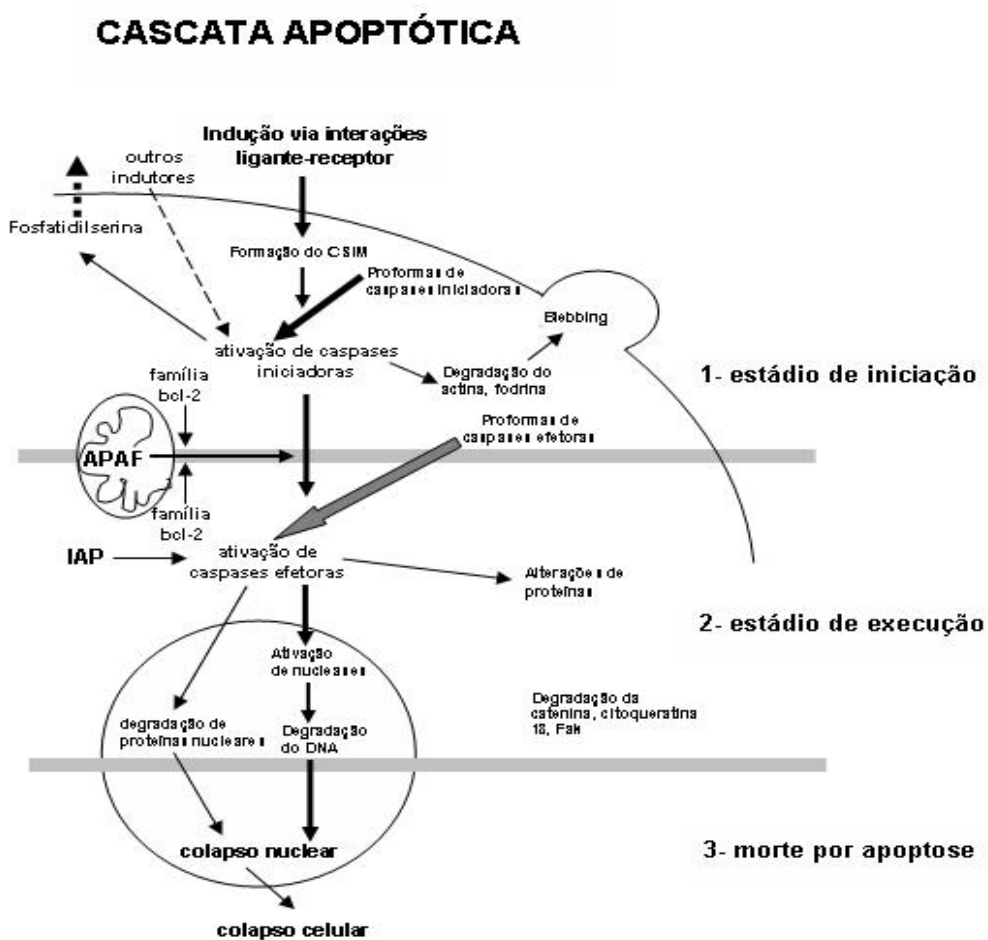


Figura 1. Cascata apoptótica em células de mamíferos (adaptado de Hansen, 2001). APAF = fator de ativação de protease associada a apoptose; IAP = proteínas inibidoras de apoptose; fak = kinase de adesão focal; bcl-2 = b-cell lymphoma-2.

A apoptose tem sido avaliada em oócitos (WASIELAK; BOGACKI, 2007) e embriões bovinos após o estágio de oito células, quando o genoma embrionário é ativado (MAKAREVICH; MARKKULA, 2002). Condições sub-ótimas de cultura também estão associadas à indução de apoptose em oócitos e embriões (MAKAREVICH; MARKKULA, 2002; WASIELAK; BOGACKI, 2007). O índice apoptótico pode ser, portanto, um indicador da qualidade oocitária e embrionária (MAKAREVICH; MARKKULA, 2002).

#### **2.3.3.2. Apoptose em oócitos**

Em mamíferos, a morte celular programada tem sido identificada como o mecanismo responsável pela depleção de oócitos do pool de reserva ovariana ao longo da vida reprodutiva (MORITA; TILLY, 1999; TILLY, 2001; YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002). Os folículos ovarianos que escapam do processo de atresia continuam a se desenvolver até a ovulação. Após a ovulação, se a fertilização não ocorrer dentro de um determinado tempo (suíno: 8-10 h; humano: 6-24 h; bovino: 20-24), o oócito perde sua capacidade fertilizante e entra em degeneração (TAKASE et al., 1995; YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002). Além dos eventos fisiológicos, vários estímulos patológicos como radiação, quimioterapia, agentes tóxicos do ambiente, estresse oxidativo e estresse térmico podem iniciar a apoptose em oócitos de mamíferos (TAKASE et al., 1995; PEREZ; TILLY, 1997; HU et al., 2001; MATIKAINEN et al., 2001; YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002).

Esteróides gonadais são eficientes reguladores da morte celular ovariana por apoptose. O tratamento de animais com estrógenos inibe, enquanto andrógenos

estimulam o processo apoptótico (HARMAN et al., 1975; HSUEH et al., 1994). A progesterona, agindo por meio de receptores específicos, inibe o processo apoptótico em células da granulosa (PELUSO; PAPPALARDO, 1994). Fatores parácrinos, como o IGF-I, também suprimem a apoptose em células da granulosa e oócitos (MONGET; MONNIAUX, 1994; MAKAREVICH; MARKKULA, 2002).

Tem sido observado que oócitos de qualidade inferior são destinados à apoptose (YUAN et al., 2005). A apoptose e sua função nas perdas embrionárias em bovinos têm sido amplamente investigados (BYRNE et al., 1999; NEUBER et al., 2002). Correlação entre apoptose e degeneração de oócitos murinos mantidos *in vitro* foi observada por PEREZ et al. (1999) e confirmada por critérios morfológicos e análise da fragmentação do DNA pela reação de TUNEL. Um estudo realizado por YANG e RAJAMAHENDRAN (2002) constatou que complexos cumulus-oócitos de qualidades inferiores têm a maioria de seus oócitos com anomalias morfológicas incluindo a retração e fragmentação do citoplasma e das células do cumulus, características típicas de células submetidas ao processo de morte celular por apoptose (KERR et al., 1972). VAN BLERKOM e DAVIS (1998) questionaram a ocorrência de apoptose em oócitos murinos e humanos, pois a fragmentação do DNA raramente foi observada em oócitos ovulados e cultivados *in vitro*. Contrariamente, WASIELAK e BOGACKI (2007) detectaram aumento significativo nos percentuais de oócitos apoptóticos após a maturação *in vitro* sem suplementação. A ocorrência de apoptose em oócitos bovinos maturados *in vitro* tem sido fortemente associada à suplementação dos meios de cultura, incluindo o soro, albuminas, fatores de crescimento e hormônios (MAKAREVICH; MARKKULA, 2002; SIRISATHIEN; BRACKETT, 2003; BOELHAUVE et al., 2005) e também a outros fatores

determinados pelas condições de cultura como tensão de oxigênio (YUAN et al., 2003), estresse oxidativo (TATEMOTO et al., 2000) e estresse térmico (ROTH; HANSEN, 2004).

### **2.3.3.3. Apoptose em embriões**

Nas espécies de mamíferos, as perdas embrionárias podem ocorrer em todas as fases da gestação (DUNNE et al., 2000). A incidência de perda embrionária em novilhas inseminadas artificialmente pode chegar a 22% no 14º dia de gestação, sem perdas adicionais até o 30º dia. No intervalo correspondente ao 30º dia até o período final da gestação, as perdas embrionárias/fetais alcançam índices próximos de 5% indicando que a maioria das perdas ocorre durante as duas primeiras semanas do desenvolvimento embrionário (DUNNE et al., 2000).

Embora se saiba muito pouco sobre os possíveis sinais que gatilham a apoptose em embriões e os mecanismos precisos pelos quais o programa de morte celular seja executado e controlado, todas as vias apoptóticas terminam com a ativação das caspases (COHEN, 1996; COHEN, 1997; SALVESEN; DIXIT, 1997). A presença de blastômeros apoptóticos em embriões de mamíferos em fase de pré-implantação tem sido descrita em várias espécies, incluindo camundongo, ovelha, cavalo, vaca, porco e humanos (HARDY et al., 1989; HARDY, 1997; SALVESEN; DIXIT, 1997).

Em mórulas e blastocistos humanos apresentando desenvolvimento normal, algumas células são submetidas espontaneamente ao processo de apoptose, o que indica a existência de um mecanismo fisiológico para a adequação do número de

células embrionárias e sua funcionalidade e para a eliminação de células anormais (WYLLIE, 1992). Em camundongos, a apoptose está envolvida na eliminação de embriões anormais durante o primeiro ciclo de clivagem e no segundo ciclo em humanos (JURISICOVA et al., 1996). O processo apoptótico tem sido observado em embriões bovinos após o estágio de 8 células (BYRNE et al., 1999), quando o genoma embrionário é ativado (FREI et al., 1989). A maioria dos núcleos apoptóticos em blastocistos bovinos concentra-se na massa celular interna (MCI), enquanto se distribuem aleatoriamente no embrião humano (JURISICOVA et al., 1998). Durante o período pré-implantacional o embrião depende quase que exclusivamente do RNAm materno e das reservas oocitárias de proteínas acumuladas antes da ovulação. Portanto, é possível que o embrião perca a viabilidade e não seja capaz de sobreviver por não possuir os produtos de origem materna necessários, ou por não expressar seus genes no momento certo (JURISICOVA et al., 1996; MEIRELLES et al., 2004).

Uma das alterações mais freqüentes encontradas durante o desenvolvimento pós-clivagem do embrião está relacionada com a fragmentação nuclear atribuída ao processo de morte celular programada, com maior acometimento das células da MCI. Acredita-se que o objetivo deste mecanismo seja eliminar algumas destas células que impeçam o potencial de desenvolvimento do trofotoderma (TE) e que possam ser letais ao embrião (HARDY, 1997). A apoptose pode ser vista como um mecanismo de adaptação para permitir a sobrevivência embrionária e o desenvolvimento em condições de estresse (PAULA-LOPES; HANSEN, 2002). A condensação da cromatina e a fragmentação nuclear são observadas em 70%-80% do total de blastocistos produzidos *in vitro* em

camundongos (HANDYSIDE; HUNTER, 1984), em humanos (HARDY et al., 1989) e em praticamente todos os blastocistos bovinos (BYRNE et al., 1999) e a presença destas mudanças celulares tem sido consideradas evidência de atividade apoptótica. Tem sido observado que embriões produzidos *in vitro* têm maior índice de fragmentação de blastômeros que embriões produzidos *in vivo* (JURISICOVA et al., 1996; SIRISATHIEN; BRACKETT, 2003). Em adição, blastocistos partenotos apresentam menor número de células e maior número de núcleos TUNEL positivos que blastocistos resultantes de oócitos inseminados. Há poucos dados na literatura sobre a influência da suplementação dos meios de cultura no índice de apoptose em embriões produzidos *in vitro*. SIRISATHIEN e BRACKETT (2003) obtiveram índices de fragmentação nuclear em blastocistos bovinos resultantes de oócitos maturados em meio definido com PVA comparáveis a blastocistos produzidos *in vitro* em sistemas convencionais de cultivo (BYRNE et al., 2002). Outros autores afirmam que o microambiente durante a MIV não afeta significativamente a fragmentação nuclear nos blastocistos produzidos *in vitro* (WATSON et al., 2000; CHUNG et al., 2007). No entanto, CUI et al. (2004) sugerem que o soro afeta significativamente a expressão de genes reguladores de apoptose, resultando em alterações na apoptose e viabilidade de embriões suínos.

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

fragmentação nuclear proporcionam maiores chances de sobrevivência embrionária (WARNER et al., 1998).

#### **2.4. Sistemas de maturação *in vitro***

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

##### **2.4.1. Meio TCM-199**

O meio de cultivo tecidual 199 (TCM-199) é considerado o meio padrão para a maturação *in vitro* de oócitos e é utilizado na maioria dos protocolos de MIV com ou sem suplementação de soro, modificado conforme a rotina do laboratório (KESKINTEPE; BRACKETT, 1996). Geralmente, são adicionados, L-glutamina, bicarbonato de sódio, HEPES, piruvato de sódio e hormônios. Vários estudos demonstram que o TCM-199 suplementado com fatores de crescimento e/ou hormônios melhora a maturação citoplasmática quando comparado com outros meios de cultura (LONERGAN et al., 1994). No entanto, por ser um meio muito complexo não é possível relacionar especificamente os componentes que são responsáveis pelos diferentes resultados obtidos. GANDHI et al. (1994) reportam que o TCM apresenta algum efeito na maturação que resulta em uma maior divisão celular e conseqüentemente em melhor desenvolvimento embrionário.

Outros estudos estão focados na elaboração de meios de cultura para a MIV em sistema livre de soro (GARDNER, 1994; KESKINTEPE; BRACKETT, 1996; ALI; SIRARD, 2002; CHUNG et al., 2007). Estes estudos têm obtido sucesso no desenvolvimento de embriões bovinos até o estágio de blastocisto, usando o meio TCM 199 como base para a MIV. Contudo, ainda não se sabe como a composição básica do meio interfere na maturação oocitária.

#### **2.4.2. Meio alfa-MEM**

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

O meio  $\alpha$ -MEM foi testado pela primeira vez para a MIV de oócitos bovinos por ROSE e BAVISTER (1992). Os autores compararam 7 meios de cultura diferentes utilizando o TCM como controle e obtiveram resultados semelhantes ao controle para 4 meios avaliados (SFRE, MEM $\alpha$ , MEM $\alpha$ +, RPMI:MEM $\alpha$ ).



Entretanto, mesmo com os resultados obtidos neste estudo seu uso não foi difundido para a maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

WRIGHT et al. (1999) reportam que o cultivo de folículos ovarianos humanos em meio  $\alpha$ -MEM resultou em aumento significativo na iniciação e crescimento dos folículos durante os primeiros dez dias de cultura. WUN et al. (1994) obtiveram aumento no índice de embriões produzidos e nas taxas de gestação clínica de embriões murinos cultivados em meio  $\alpha$ -MEM. Resultados similares foram relatados em outro estudo, no qual foi observado aumento significativo nas taxas de formação e eclosão de blastocistos e do número de células/blastocistos em embriões murinos cultivados no meio  $\alpha$ -MEM (ROUDEBUSH et al., 1994). Outros dois estudos demonstraram influência positiva do meio  $\alpha$ -MEM no desenvolvimento de embriões murinos e humanos, com aumento nos índices de gestação e redução nas taxas de aborto espontâneo (LOPATA; HAY, 1989; OLAR; POTTS, 1993).

### **2.4.3. Suplementos**

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

#### **2.4.3.1. Soro e proteínas**

A suplementação protéica tem mostrado ser um fator crucial na eficiência dos sistemas de cultura *in vitro*. O soro e albumina sérica bovina (BSA) são as fontes

proteicas mais comumente utilizadas como suplemento nos meios de cultura de oócitos e embriões de mamíferos. Entretanto, estes compostos podem ser contaminados com diversas moléculas definidas e indefinidas, tais como esteróides, colesterol, peptídeos, às quais o oócito e embrião não são expostos *in vivo* (GARDNER, 1994). Segundo alguns autores, as preparações comerciais de BSA têm apresentado variações significativas entre lotes, as quais podem afetar positiva ou negativamente os resultados *in vitro* (BAVISTER; MCKIERNAN, 1991; GRAY et al., 1992; MCKIERNAN; BAVISTER, 1992). Alguns estudos também demonstram um efeito bifásico do soro no desenvolvimento embrionário, com efeito inibitório nos primeiros estádios de clivagem e efeito estimulatório nos estádios mais tardios da embriogênese, no desenvolvimento de mórulas até o estágio de blastocisto, acelerando o processo de blastulação (WANG et al., 1997), aumentando o número de blastômeros e estimulando a eclosão (PINYOPUMMINTR; BAVISTER, 1991). O soro adicionado ao meio de MIV frequentemente permite uma melhora na qualidade do oócito, na taxa de fertilização e no desenvolvimento embrionário. No entanto, a repetibilidade de resultados, quando se utiliza o soro, pode variar de acordo com a partida e, por tratar-se de produto biológico é preciso considerar o risco de contaminação por agentes bacterianos e virais (PINYOPUMMINTR; BAVISTER, 1991; WANG et al., 1997; WANG et al., 2006; SAGIRKAYA et al., 2007).

Adicionalmente, a suplementação com soro pode induzir alterações na transcrição de genes relacionados com o desenvolvimento, independente do estágio da cultura (maturação *in vitro*, fertilização ou cultivo pós-fertilização (WRENZYCKI et al., 1999; RUSSELL et al., 2006), afetar os processos celulares de apoptose (WARZYCH et al., 2007) e a esteroidogênese das células do cumulus (GUTIERREZ et al., 1997).

#### 2.4.3.2. Hormônios e fatores de crescimento

A suplementação hormonal, incluindo gonadotrofinas, fatores de crescimento e esteróides, na MIV, embora rotineiramente empregada, tem sido controversa, havendo grande variação entre os protocolos experimentais (ANDERIESZ et al., 2000; DODE; GRAVES, 2002; ALI et al., 2005; BEKER-VAN WOUDEBERG et al., 2006). É usual a utilização do FSH ou do LH ou ainda a combinação dessas gonadotrofinas. No entanto, há vários questionamentos sobre a real necessidade desses hormônios e as concentrações a serem utilizadas. Brackett et al. Demonstraram que o uso de preparações altamente purificadas de LH no meio de MIV aumenta a qualidade oocitária e o índice de produção *in vitro* de embriões. ZUELKE e BRACKETT (1990) reportaram efeito benéfico do LH na MIV em meio livre de soro. Os mecanismos pelos quais o LH influencia a maturação do oócito bovino incluem mudanças na distribuição do cálcio no citoplasma, aumento da glicólise e da oxidação mitocondrial nas CC, além de aumentar o metabolismo da glutatona no oócito. O FSH é utilizado com frequência nos sistemas de MIV de oócitos bovinos e estudos recentes sugerem que sua presença no meio de cultura é necessária apenas nas primeiras horas de MIV (ALI; SIRARD, 2005). O FSH estimula a secreção de E2 pelas CC, a síntese e secreção de ácido hialurônico e estimula a plasmina (RICHARDS et al., 2002), regulando a expansão do cumulus durante a MIV.

A função dos esteróides na MIV do oócito ainda não está estabelecida. A suplementação do meio de maturação com estradiol, geralmente em doses farmacológicas, é controversa e há grande variação nos resultados obtidos em diferentes estudos (ALI; SIRARD, 2002; BEKER et al., 2002; MOREIRA et al.,

2002; LATTANZI et al., 2003). Além disso, não está claro se a suplementação com estradiol exógeno é necessária para o cultivo do oócito, uma vez que a secreção deste esteróide tem sido demonstrada em culturas *in vitro* de CG murais e CC humanas (SCHUETZ et al., 1992; CHIAN et al., 1999), de ratas (SHERIZLY; KRAICER, 1980), bovinas (MINGOTI et al., 2002; SCHOENFELDER et al., 2003), ovinas (CAMPBELL et al., 1996) e suínas (CHANNING et al., 1981). O estradiol promove alterações na reatividade do sistema de liberação do cálcio durante a maturação citoplasmática do oócito (TESARIK; MENDOZA, 1997), o que permite a típica oscilação do cálcio durante a fertilização (HERBERT et al., 1997). Também tem sido descrito que o estradiol inibe a apoptose induzida por estresse oxidativo em células ovarianas (MURDOCH, 1988). Entretanto, quando presente em altas concentrações, o estradiol pode exercer efeito adverso na formação do fuso meiótico e extrusão do corpúsculo polar (KRUIP et al., 1988). A progesterona, embora com menor frequência, também é utilizada como suplemento na MIV. Considerando que a secreção de progestágenos aumenta tardiamente no período pré-ovulatório sua adição ao meio de MIV seria justificável. ZHENG et al. (2003) sugerem que os níveis de progesterona no fluido folicular estão correlacionados com a maturidade e qualidade de oócitos de primatas humanos e não-humanos. Em anfíbios e peixes, a progesterona, ou seus análogos, induz a maturação oocitária, atuando principalmente na superfície do oócito, em receptores de membrana específicos, a despeito da via genômica convencional (SADLER; MALLER, 1982; NAGAHAMA; ADACHI, 1985; MORRISON et al., 2000). No entanto, ainda se sabe muito pouco sobre os efeitos genômicos e não genômicos dos esteróides foliculares em oócitos de mamíferos (TESARIK; MENDOZA, 1997).

A adição de fatores de crescimento aos sistemas de MIV tem mostrado ser vantajosa. O IGF-I, sozinho ou em associação com a insulina, estimula a maturação oocitária e a esteroidogênese das CC (GUTIERREZ et al., 1997; MAKAREVICH; MARKKULA, 2002; SPICER et al., 2002; SHIMIZU et al., 2007). Como este peptídeo apresenta ação gonadotrófica e age em sinergismo com o FSH para estimular a atividade ovariana, sua inclusão em meios de MIV livres de soro pode ser importante. Em meio de cultura definido alguns estudos têm demonstrado mais claramente, sem os artefatos do soro, a função das gonadotrofinas e fatores de crescimento na maturação oocitária. Contudo, ainda não há um consenso acerca da melhor e mais adequada suplementação com hormônios e fatores de crescimento.

#### 2.4.3.3. Macromoléculas sintéticas

O álcool polivinílico (PVA)  $[-CH_2CHOH-]_n$  e a polivinilpirrolidona (PVP)  $(C_6H_9NO)_n$  (figura 2) são polímeros sintéticos, hidrofílicos, com peso molecular entre 30.000 a 70.000, utilizados no meio de cultura celular para a estabilização da pressão osmótica, como surfactantes e agentes quelantes de metais pesados (HIRAO et al., 2004).



Figura 2. Estrutura química do álcool polivinílico e da polivinilpirrolidona-40

Há evidências que o PVA e o PVP-40 podem substituir proteínas (ALI; SIRARD, 2002) e o soro na maturação *in vitro* de oócitos bovinos sem comprometer o desenvolvimento subsequente (DOWNS et al., 1991; LONERGAN, 1992; MONAGHAN et al., 1993; KESKINTEPE; BRACKETT, 1996; WATSON et al., 2000; MIZUSHIMA; FUKUI, 2001; ALI; SIRARD, 2002). Estudos prévios demonstraram que o PVP não é somente um substituto adequado para o soro, mas é benéfico para a MIV e está associado a aumento da qualidade do embrião (SIRARD; COENEN, 1993; CHUNG et al., 2007). Embora existam poucos relatos sobre as propriedades físico-químicas destes polímeros, sabe-se que os mesmos podem exercer influência nas propriedades de adesão das células, adsorção de proteínas e difusão de fatores parácrinos e autócrinos no meio de cultura (MATSUDO et al., 2003; HIRAO et al., 2004). O PVP parece diferir do PVA em algumas propriedades como peso molecular, solubilidade e pH. De fato WANG et al. (2004) citam que diferentes polímeros podem apresentar diferentes propriedades, incluindo peso molecular, tipo e densidade de cargas, estrutura e seqüência, e flexibilidade conformacional da molécula, as quais estão associadas à diferenças na citotoxicidade.

### 3. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do sistema de maturação *in vitro* quimicamente definido, padronizado com o meio de cultura  $\alpha$ -MEM suplementado com PVA ou PVP-40, na viabilidade do oócito para o desenvolvimento pré-implantacional. Entre os objetivos específicos, foram avaliados:

1. Desenvolvimento embrionário inicial de oócitos maturados em meio quimicamente definido com PVA.
2. Substituição do PVA por PVP-40 no sistema de maturação *in vitro* quimicamente definido para a produção *in vitro* de embriões (PIV).
3. Produção de estradiol e progesterona por complexos cumulus-oócito bovinos durante a MIV em meio quimicamente definido com PVA ou PVP-40.
4. Expressão dos genes Hsp-70 e Bax nos embriões produzidos em sistema de maturação *in vitro* quimicamente definido, suplementado com PVA ou PVP-40, por meio da técnica de PCR em Tempo Real.
5. Índice de fragmentação internucleossômica do DNA das células embrionárias dos embriões produzidos em sistema de maturação *in vitro* quimicamente definido, suplementado com as macromoléculas PVA ou PVP-40.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1- Colheita e manipulação dos ovários para a aspiração folicular**

Os ovários foram obtidos de vacas abatidas em matadouro. Imediatamente após o abate, os ovários foram removidos e imersos em solução fisiológica a 35-37° C, acrescida de penicilina e estreptomicina (SIRARD; BILODEAU, 1990). Posteriormente, foram levados ao laboratório, lavados em solução fisiológica pré-aquecida na temperatura de 37° C e mantidos nesta mesma solução, em banho-maria, durante a aspiração dos folículos ovarianos.

### **4.2- Aspiração e seleção dos Complexos Cumulus-Oócito (CCOs)**

Foram selecionados folículos apresentando entre 2 e 8 mm de diâmetro, boa vascularização e coloração do fluido folicular. A aspiração dos oócitos foi realizada com agulhas 25x7, adaptadas em seringas de 20 mililitros. Ao serem puncionados os folículos, o fluido folicular foi imediatamente aspirado e depositado em cálice cônico mantido à temperatura de 38-39° C. Após a decantação por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado com meio Talp-Hepes e transferido para placa de Petri mantida em mesa aquecedora na temperatura de 38° C.

Os oócitos Grau 1, apresentando citoplasma uniforme e mais de três camadas de células compactas, foram selecionados para a MIV. Os complexos cumulus-oócitos foram lavados em meio Talp-Hepes, por meio do transporte destes para uma nova placa de Petri contendo o mesmo meio, com auxílio de micropipeta,



em microscópio estereoscópio. Em seguida, os oócitos foram lavados novamente em placa de vidro escavada contendo a solução de lavagem e o meio de maturação dos respectivos tratamentos e transferidos para a placa de cultura.

#### **4.2.1. Maturação *in vitro***

Os CCOs imaturos foram cultivados em meio  $\alpha$ -MEM acrescido de 0,1% de álcool polivinílico (PVA) (Sigma) ou polivinilpirrolidona (PVP-40) (Sigma); 100 ng/ml de insulina bovina (Sigma); 10 ng/ml de IGF-1 recombinante humano (Invitrogen);  $10^{-7}$  M de androstenediona (Sigma); 10 mM de bicarbonato de sódio (Gibco); 0,02 M de hepes e antibióticos (10000 UI de penicilina e 10000 UI de estreptomicina) (Sigma) ou TCM-199 suplementado com 10% de soro de vaca em estro inativado a 56° C durante 30 minutos e 20  $\mu$ g/ml de FSH (Folltropin- Vetrepharm Canadá, London, ON, Canadá). Em todos os tratamentos, os COCs foram mantidos em placa NUNC de quatro poços contendo 400  $\mu$ l dos meios de cultura dos respectivos tratamentos, na densidade de 1 COC para cada 10  $\mu$ l de meio, e cultivados durante 22-24 horas à temperatura de 38,5° C, atmosfera úmida, com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.3. Fecundação *in vitro* e desenvolvimento embrionário precoce**

##### **4.3.1- Preparação Espermática**

Foi utilizado sêmen bovino congelado em palhetas de 0,5 ml na concentração de  $2 \times 10^6$  espermatozóides para cada inseminação. As palhetas foram

descongeladas em banho-maria a 37° C por 60 segundos. Após a descongelação, o sêmen foi processado para a separação dos espermatozóides vivos, capacitação e inseminação. A capacitação espermática foi realizada segundo a metodologia de migração ascendente (swim up) descrita na literatura (PARRISH, 1985).

#### **4.3.2. Inseminação *in vitro***

Imediatamente após a capacitação espermática, os oócitos foram lavados em meio Fert-Talp, transferidos para microgotas de 50 µl de meio de fecundação (Fert-Talp) na densidade de 20 a 25 COCs por gota e inseminados. A seguir, foram incubados por 18 a 22 horas em estufa a 38,5° C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de ar atmosférico e 95% de umidade.

#### **4.3.3. Cultivo dos zigotos e avaliação do desenvolvimento embrionário**

Os zigotos foram cultivados durante 10 dias, em placas de cultivo contendo 50 µl de meio CR2 suplementado com soro fetal bovino (SFB), aminoácidos e antibióticos (PARRISH et al., 1988), previamente equilibrado à temperatura de 39° C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de ar atmosférico e 95% de umidade. Os embriões foram cultivados em grupos de 20 para cada 50 µl de meio CR2, renovado a cada 48 horas.

A taxa de clivagem foi avaliada 72 horas pós-inseminação (hpi), as taxas de mórulas e blastocistos 168-192 hpi e as taxas de eclosão 192-224 hpi.

#### **4.4 - Dosagens Hormonais**

Os meios de cultura retirados antes (tempo 0h) e no final da MIV foram estocados em freezer a -20°C para as dosagens de progesterona e 17β-estradiol segundo método de quimioluminescência, que combina anticorpos específicos com enzima amplificada, em um aparelho Immulite – Diagnostic Products Corporation (DPC).

#### **4.5- Expressão Gênica**

Para a avaliação da expressão gênica, embriões de oito dias foram retirados da gota de cultivo, lavados em meio TALP-Hepes e congelados em criotubo em volume de 1 µl do meio TALP-Hepes, com no máximo dez blastocistos por tubo. Os criotubos foram imediatamente submergidos em nitrogênio líquido e depois armazenados em freezer a -80°C. Os embriões foram processados para a avaliação da expressão dos genes H2a, Hsp-70 e Bax de acordo com as técnicas descritas a seguir.

##### **4.5.1- Primers**

Os primers utilizados para avaliar a expressão dos genes (HSP-70, H2a e Bax) foram desenhados usando o programa Primer Express (Applied Biosystem) ou Primer3 a partir de seqüências obtidas do banco de dados do GeneBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (tabela 1).

#### **4.5.2- Extração e amplificação do RNA**

O RNA total foi extraído de conjunto de 8 a 10 embriões. Foram utilizados kits apropriados para extração de pequenas amostras (RNeasy Micro Kit, Quiagen), seguindo-se as recomendações do fabricante. A primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando-se 8 µl da solução com RNA, 200 U de Superscript II RT (Invitrogen) e 1 µl de oligo-dT<sub>18</sub> primers (0,5 mg/µl), 1 µl de dNTPs (10 mM), 2 µl de tampão RT, 4µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2µl de DTT (0,1 M) e 40 U de RNaseOUT (inibidor de RNase) em 20 µl de solução. A reação de síntese do cDNA foi conduzida por 50 min a 50°C seguidos de 5 min a 85°C e resfriamento no gelo. Em seguida, foi adicionado 2U de RNase e o conteúdo incubado por mais 20 min a 37°C e então resfriado no gelo. O cDNA produzido foi armazenado a -70°C até o momento da reação de PCR.

#### **4.5.3- Análise da expressão dos genes HSP-70 e BAX**

A quantificação do cDNA foi feita utilizando-se a metodologia do PCR em Tempo Real. As reações foram feitas utilizando-se o kit comercial com SYBR® Green, de acordo com as recomendações do fabricante. Brevemente, a reação contendo cDNA, par de primers, Master Mix (dNTPs, referência passiva, SYBER Green, etc.) e 0,1 µl de Taq DNA Polimerase, em um volume final de 50 µl, foi incubada a 95°C por 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, anelamento a temperatura específica para cada primer por 15 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. Controles negativos foram preparados em que o RNA ou a enzima transcriptase reversa foram omitidos durante a reação de RT. As amostras foram então incubadas no termociclador ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) (tabela 1).

Tabela 1- Sequência, temperatura de anelamento e tamanho do fragmento de primers. PCR-Real Time.

| Gene   | Sequence 5' to 3'   | Annealing Temperature (°C) | Fragment size (bp) | Genebank access nº |
|--------|---|----------------------------|--------------------|--------------------|
| Hsp-70 | 5'- AACAAAGATCACCATCACCAAACG<br>3'- TCCTTCTCCGCCAAGGTGTTG   | 59                         | 275                | NM174550           |
| Bax    | 5'- TTTTGCTTCAGGGTTTCATCCAGGA<br>3'- CAGCTGCGATCATCCTCTGCAG | 64                         | 174                | NM173894           |
| H2A    | 5'- GCCATCCTGGCGTACCTCAC<br>3'- TGGATGTGTGGAATGACACC        | 52                         | 176                | NM174809           |

A análise dos resultados do PCR quantitativo foi realizada usando-se o método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , sendo que os resultados foram expressos relativos a um grupo referência ou calibrador. Neste experimento o grupo referência foi o grupo constituído pelos embriões oriundos de oócitos maturados *in vitro* no meio TCM-199. O  $C_T$  do gene alvo (Hsp-70 ou Bax) e do gene controle endógeno (Histona H2a) foram determinados para cada amostra. A diferença entre o  $C_T$  do alvo e o  $C_T$  endógeno, denominado  $\Delta C_T$ , foi calculada para cada amostra nos grupos referência (TCM-199) e experimental ( $\alpha$ -MEM + PVA ou PVP-40), objetivando-se normalizar as diferenças nas extrações de RNA e eficiência das reações de transcrição reversa. O  $\Delta C_T$  de cada gene obtido em cada amostra do grupo experimental foi subtraído do  $\Delta C_T$  obtido no grupo referência, o resultado obtido é chamado de  $\Delta\Delta C_T$  ( $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Exp}} - \Delta C_{T \text{ Ref}}$ ). A quantidade do gene alvo no grupo experimental, já normalizada pelo controle endógeno (gene Histona 2a) e pelo grupo referência ( $\Delta C_T$  do grupo referência), foi calculada usando  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Deste modo, os dados obtidos foram expressos no grupo experimental como X vezes relativas ao grupo referência.

A identidade dos transcritos dos genes foi confirmada por eletroforese em gel de agarose, com brometo de etídio a 3% (figura 6).

## **4.6- Apoptose**

### **4.6.1. Técnica de TUNEL**

A técnica de TUNEL (do inglês, *Terminal deoxynucleotidyl transferase Uracil Nick End Labeling*) identifica *in situ*, a fragmentação internucleossômica do DNA. Esta avaliação foi realizada com o kit “*In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein*” (Roche®, Germany) como descrito a seguir.

### **4.6.2. Fixação dos blastocistos**

Embriões eclodidos foram removidos do cultivo, lavados 3 vezes em gotas de 50 µl de solução tampão de PBS acrescido de 0,1% de PVP, transferidos de gota em gota e fixados em placa NUNC em gotas de 400 µl de solução fixadora de paraformaldeído (PFD) a 4% + solução tampão por 1 hora a temperatura ambiente.

### **4.6.3. Permeabilização**

Após a fixação, os embriões foram lavados novamente e foram transferidos para gotas de 400 µl de solução permeabilizadora em placa NUNC por 1 hora a 2-8° C.

### **4.6.4. Incubação com DNase**

Na etapa subsequente à permeabilização, os embriões foram divididos em controles positivos, negativos e amostra. Os embriões destinados ao grupo positivo foram incubados em solução de DNase, recém preparada, durante 1 hora em câmara úmida acondicionada em estufa de secagem a 37° C. Os embriões destinados ao

grupo negativo e amostra permaneceram durante este tempo em solução tampão em placa NUNC nas mesmas condições. Após a incubação com DNase, os embriões foram novamente lavados, como descrito anteriormente.

#### **4.6.5. Reação de TUNEL**

Os embriões destinados ao grupo positivo e amostra foram incubados em gotas de 10  $\mu$ l, contendo 45  $\mu$ l da solução enzimática e 5  $\mu$ l solução marcadora de TUNEL, em lâmina com aro acondicionada em câmara úmida por 1 hora a 37°C.

#### **4.6.6. Coloração – Hoescht**

Após a reação de TUNEL os embriões foram lavados e incubados com Hoescht 33342 em gotas de 20  $\mu$ l a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, os embriões foram novamente lavados e transferidos para lâminas em gotas de 10  $\mu$ l de glicerol e cobertos com lamínula, vedada com esmalte.

#### **4.6.7. Avaliação dos embriões**

Os embriões foram examinados por epifluorescência em microscópio Zeiss Axiovert 200 utilizando os filtros padrões para a excitação e emissão da fluoresceína (filtros DAPI e FITC) com aumento de 40x. Foram contados os núcleos intactos, apresentando fluorescência azul (Hoescht) e os núcleos TUNEL positivos ou apoptóticos, apresentando fluorescência verde (corante FITC).

Os blastocistos fixados em diferentes dias do CIV (D7 a D9) foram analisados separadamente.

## **4.7. Delineamento experimental**

**4.7.1. Experimento 1: Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos maturados em meio quimicamente definido com PVA.**

**4.7.2. Experimento 2: Substituição do PVA por PVP-40 no sistema de maturação *in vitro* quimicamente definido para a produção *in vitro* de embriões (PIV).**

Nesses experimentos foi investigada a influência do sistema de maturação *in vitro* quimicamente definido, padronizado com o meio de cultura  $\alpha$ -MEM, suplementado com os polímeros sintéticos PVA e PVP-40, na maturação oocitária e nos índices de desenvolvimento embrionário. O pool de CCOs imaturos selecionados para a MIV foi dividido, aleatoriamente, em três grupos experimentais:

- 1)  $\alpha$ -MEM suplementado com IGF-1, insulina e 0.1% PVA
- 2)  $\alpha$ -MEM suplementado com IGF-1, insulina e 0.1% PVP-40
- 3) TCM-199 contendo FSH e 10% de soro de vaca em estro (controle)

Em cada repetição, os grupos experimentais obedeceram a uma seqüência aleatória, de forma a evitar que os oócitos fossem selecionados para grupos conhecidos. A embriogênese foi avaliada pela determinação das taxas de clivagem, formação de blastocistos e eclosão.



#### **4.7.3 Experimento 3: Produção de estradiol e progesterona por complexos cumulus-oócito bovinos durante a MIV em meio quimicamente definido com PVA ou PVP-40.**

Ao final do período de maturação *in vitro*, amostras dos meios de cultura referentes a cada tratamento foram retiradas para a dosagem de esteróides, com o objetivo de avaliar a atividade esteroidogênica das células do cumulus nos diferentes sistemas de cultura.

#### **4.7.4. Experimento 4: Expressão dos genes Hsp-70 e Bax em embriões produzidos em sistema de maturação *in vitro* quimicamente definido por meio da técnica de PCR em Tempo Real.**

Após a determinação dos índices de produção de embriões nos sistemas de MIV avaliados, foram pesquisados os níveis de transcritos de genes associados ao estresse nos embriões resultantes de oócitos maturados nas diferentes condições de cultura, como medida da qualidade embrionária. Após a maturação e fertilização *in vitro*, os zigotos foram cultivados durante 192 hpi e os embriões em estágio de blastocisto (Bl) e blastocisto expandido (Bx) foram submetidos às técnicas de extração de RNA e de PCR em tempo real.

#### **4.7.5. Experimento 5: Índice de fragmentação internucleossômica do DNA das células embrionárias de embriões produzidos em sistema de maturação *in vitro* quimicamente definido**

Outra avaliação qualitativa dos embriões produzidos nos sistemas de MIV descritos consistiu na determinação dos índices apoptóticos dos embriões PIV. Neste experimento, os zigotos resultantes da maturação e fertilização *in vitro* foram cultivados durante 192 a 224 hpi e os blastocistos que alcançaram o estágio de eclosão (Be) foram fixados e submetidos à reação de TUNEL para a determinação do número de núcleos totais e apoptóticos nas células embrionárias.

#### **4.8. Análise estatística**

Foram analisados os dados de 12 replicatas referentes às taxas de clivagem, formação de blastocistos e eclosão. A análise estatística foi realizada por meio do teste do Qui-Quadrado ou teste de Fisher. Diferenças com  $P < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas. A quantificação relativa de transcritos dos genes Hsp-70, Bax e H2a foi avaliada por análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Student Neuman Keuls. Os valores são mostrados como média  $\pm$ erro padrão da média (SEM).

Os dados das dosagens de estradiol e progesterona foram analisados por ANOVA e a comparação das médias foi realizada aplicando teste de Tukey. A análise da frequência de fragmentação do DNA (TUNEL), bem como a quantidade de núcleos totais por embrião foi realizada pelo teste ANOVA e a comparação das médias pelo teste de Tukey.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Experimentos 1 e 2

Para testar a viabilidade do sistema de MIV quimicamente definido, proposto nos experimentos 1 e 2, foram realizadas 12 repetições com n= 1164.

A taxa de clivagem total foi maior no grupo controle (68,3%) se comparada aos grupos PVA (54,4%) e PVP-40 (58,3%) ( $P < 0,05$ ). No entanto, a proporção de embriões com mais de oito células foi similar ( $P > 0,05$ ) entre todos os tratamentos (24,4%, 28,8% e 32,6%) o que indica que a taxa de desenvolvimento durante as primeiras 72 hpi foi similar entre oócitos maturados em meio quimicamente definido e oócitos maturados em meio contendo soro (tabela 2). Também não houve diferença estatística significativa nos índices de blastocistos produzidos e nas taxas de eclosão de embriões produzidos a partir de oócitos maturados em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com PVA ou PVP-40 (figura 3) e o grupo controle, respectivamente (tabela 2).

Tabela 2. Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com PVA ou PVP-40.

| Grupo | Total zigotos | Clivagem 68-72 hpi <sup>1</sup> % (n) <sup>a</sup> |                         |                         | Blastocistos <sup>1</sup> % (n) <sup>a</sup> | Eclosão <sup>2</sup> % (n) <sup>a</sup> |
|-------|---------------|--|-------------------------|-------------------------|--|---|
|       |               | 2-8 células  | 9-16 células            | Total                   | 168-192 hpi                                  |   |
| PVA   | 410           | 29,7 <sup>a</sup> (122)                            | 24,4 <sup>a</sup> (101) | 54,4 <sup>a</sup> (223) | 40,0 <sup>a</sup> (164)                      | 36,0 <sup>a</sup> (59)                  |
| PVP   | 353           | 34,4 <sup>a</sup> (111)                            | 28,8 <sup>a</sup> (93)  | 58,3 <sup>a</sup> (204) | 44,6 <sup>a</sup> (156)                      | 34,6 <sup>a</sup> (54)                  |
| TCM   | 401           | 34,9 <sup>a</sup> (140)                            | 32,6 <sup>a</sup> (131) | 68,3 <sup>b</sup> (271) | 42,6 <sup>a</sup> (169)                      | 40,8 <sup>a</sup> (69)                  |

Hpi: horas pós-inseminação. Valores com diferentes sobrescritos na mesma coluna diferem significativamente ( $P < 0,05$ ).<sup>1</sup>Qui-Quadrado. <sup>2</sup>Teste de Fisher.

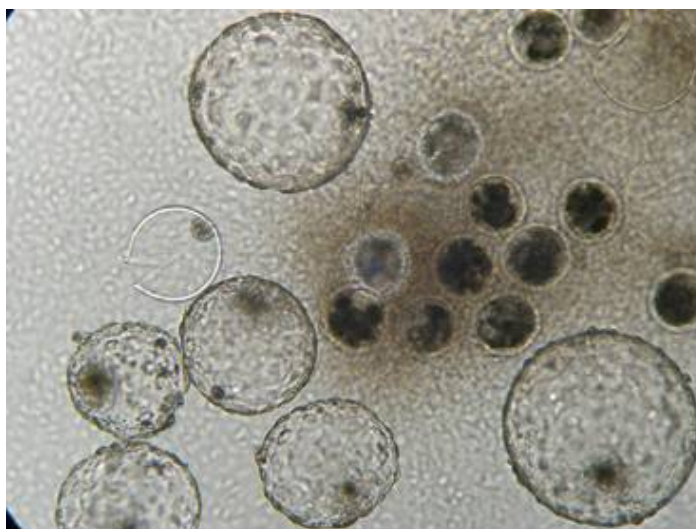


Figura 3- Blastocistos bovinos produzidos *in vitro* derivados de COCs maturados em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com PVP-40. Estádio de eclosão (D8). Aumento 20X (MO).

### 5.2. Experimento 3

Estradiol (E2) e progesterona (P4) foram dosados nos meios de cultura das amostras retiradas no tempo zero e após 24 horas de maturação *in vitro*, com o objetivo de investigar a atividade funcional das células do *cumulus oophorus* por meio da secreção destes esteróides e da relação E2:P4 (tabela 3). Os coeficientes de variação nos ensaios do E2 e P4 foram inferiores a 10%.

A concentração de estradiol (ng/ml) nos meios de cultura no tempo 0h foi diferente ( $P < 0.001$ ) entre os grupos PVA ( $0,64 \pm 0,07$ ) e PVP ( $0,01 \pm 0,005$ ), sem diferença entre PVA e TCM ( $0,13 \pm 0,02$ ) (figura 4). As concentrações de P4 no tempo 0h foram indetectáveis em todos os grupos experimentais.

A secreção de estradiol pelas células do cumulus após 24h de cultivo foi maior nos sistemas de MIV definidos (24 ng/ml e 21ng/ml para os grupos PVA e

PVP, respectivamente), em comparação com o grupo controle (0,35 ng/ml) ( $P < 0,001$ ) (tabela 3; figura 4). Não houve diferença significativa na produção de estradiol entre COCs maturados em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com PVA ou PVP-40 (tabela 3; figura 4). A secreção de progesterona após 24 horas de MIV foi menor no grupo PVP-40 ( $P < 0,001$ ), sem diferença estatística significativa entre o grupo PVA e o controle ( $P > 0,05$ ) (figura 5). Os tratamentos 1 e 2 apresentaram maior relação E2/P4 ao fim da MIV (tabela 3).

Tabela 3. Produção de estradiol e progesterona (ng/ml/24h) por complexos cumulus-oócito maturados em meio quimicamente definido (média  $\pm$  DP).

| Hormônio esteróide | Tratamentos                   |                             |                               |
|--------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
|                    | MEM- $\alpha$ + PVA           | MEM- $\alpha$ + PVP-40      | Controle                      |
| Estradiol          | 24.05 $\pm$ 5.87 <sup>a</sup> | 23.1 $\pm$ 4.7 <sup>a</sup> | 0.35 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>  |
| Progesterona       | 21.00 $\pm$ 14.6 <sup>a</sup> | 11.5 $\pm$ 9.0 <sup>b</sup> | 25.04 $\pm$ 12.4 <sup>a</sup> |
| Relação E2/P2      | 1.17                          | 2.00                        | 0.014                         |

<sup>a,b</sup>Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha diferem ( $P < 0,001$ ). ANOVA e teste de Tukey.

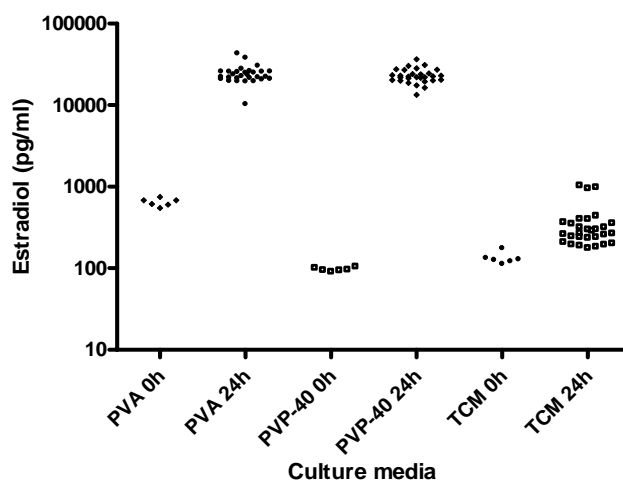


Figura 4- Concentração de estradiol (pg/ml) em diferentes meios de cultura nos tempos 0h e 24h de maturação *in vitro* de complexos cumulus-oócito bovinos. TCM-199 e  $\alpha$ -MEM, suplementado com PVA ou PVP-40.

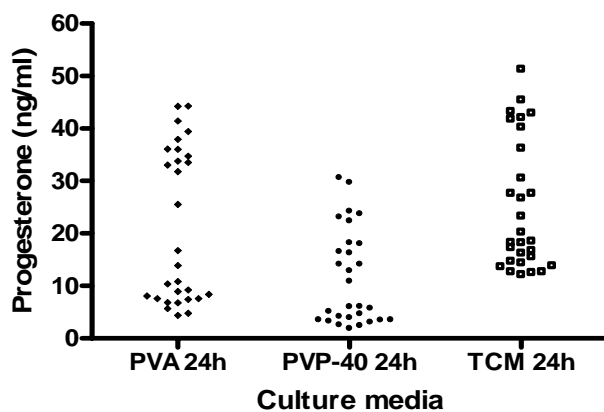


Figura 5- Concentração de progesterona (ng/ml) em diferentes meios de cultura após 24 horas de maturação *in vitro* de complexos cumulus-oócito bovinos. TCM-199 e  $\alpha$ -MEM, suplementado com PVA ou PVP-40.

### 5.3. Experimento 4

Os resultados da avaliação da expressão dos genes Hsp-70 e Bax por meio da técnica de PCR em Tempo Real encontram-se sumariados na figura 7. As curvas de amplificação e dissociação para cada gene são mostradas nas figuras 8, 9 e 10. A identidade dos transcritos dos genes foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio a 3% (figura 6).

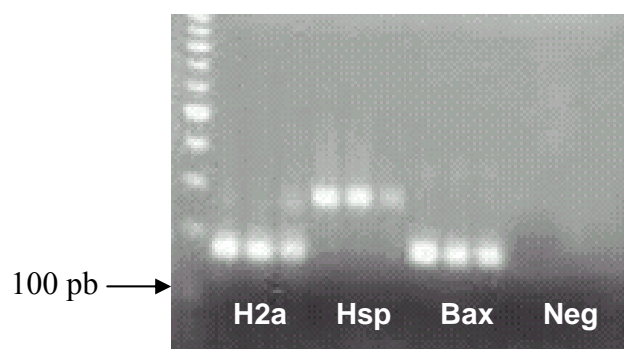


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose de transcritos dos genes H2a (176pb), Hsp-70 (275pb) e Bax (174pb). A coluna à esquerda mostra os marcadores que aumentam de tamanho a cada 100pb. No centro estão os diferentes produtos do RT-PCR usando diferentes pares de primers. À direita, os controles das reações (Neg).

A abundância relativa de transcritos dos genes foi similar nos embriões de todos os tratamentos (figura 7). Os resultados indicam que o cultivo dos oócitos no sistema de maturação *in vitro* testado, na ausência de soro e gonadotrofinas, não aumentou a expressão de transcritos de genes associados ao estresse.



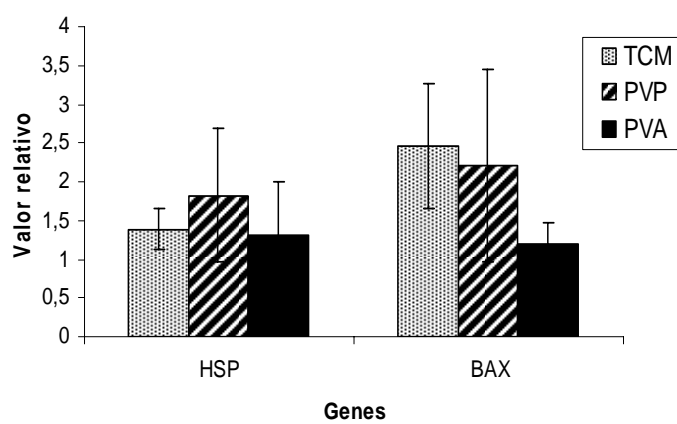


Figura 7. Expressão relativa de transcritos específicos (média ; EP) em blastocistos bovinos produzidos *in vitro* a partir de oócitos maturados em diferentes sistemas de cultura: TCM-199 e  $\alpha$ -MEM, suplementado com PVA ou PVP-40.

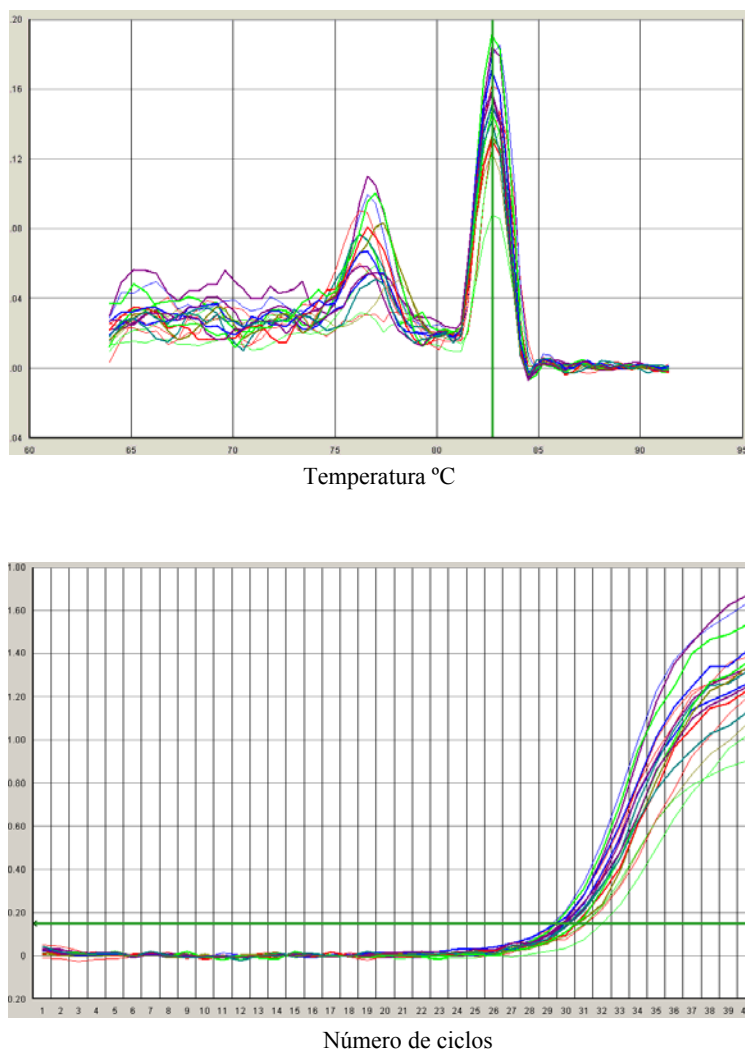


Figura 8. Curvas de dissociação e amplificação do gene H2a. PCR em Tempo Real

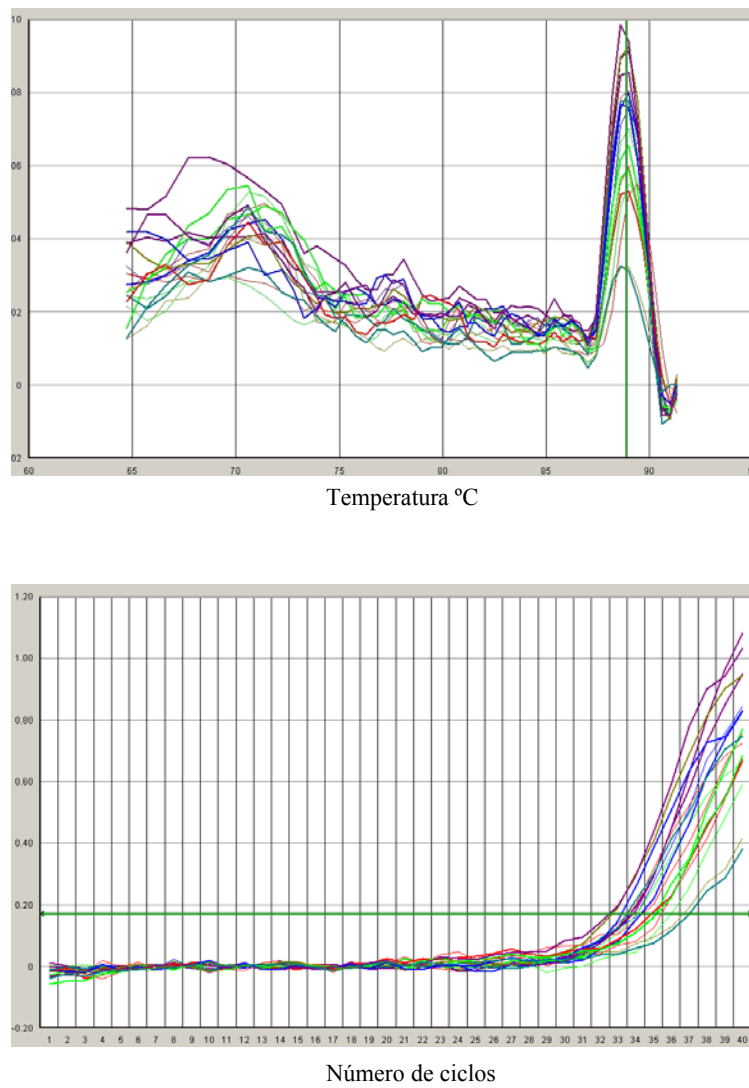


Figura 9. Curvas de dissociação e amplificação do gene Hsp-70. PCR em Tempo Real

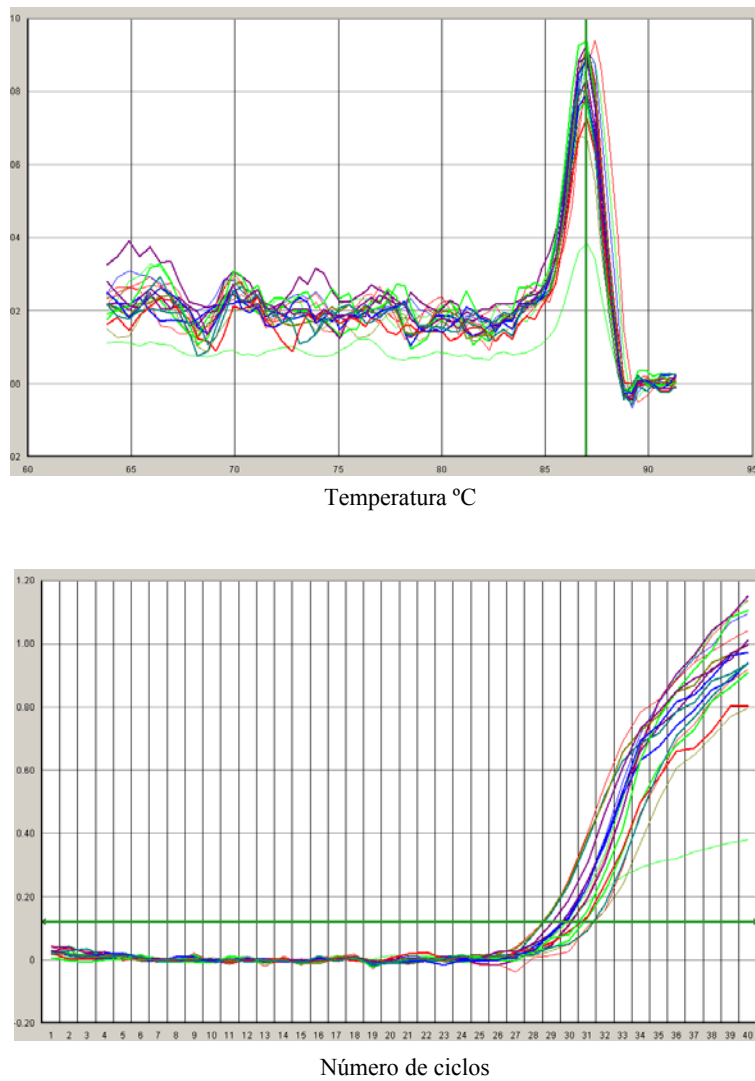


Figura 10. Curvas de dissociação e amplificação do gene Bax. PCR em Tempo Real

#### 5.4. Experimento 5

A fragmentação do DNA dos núcleos das células embrionárias foi revelada como um sinal de fluorescência verde após ligação específica com o reagente TUNEL e o conjugado FITC (figuras 11 e 12 – C e E). A figura 11 mostra a montagem das imagens obtidas de núcleos corados com FITC e HOESCHT. O número total de células dos blastocistos eclodidos no dia 8 do cultivo e o índice de fragmentação do DNA dos núcleos das células embrionárias foram similares ( $P>0,05$ ) entre o grupo controle e os grupos PVA e PVP-40 (tabela 4).

Tabela 4. Índice apoptótico e número total de células de embriões produzidos *in vitro* em sistema de MIV quimicamente definido.

| Grupo experimental | *Blastocistos (n) | Total de núcleos/blastocisto | Núcleos TUNEL positivos | Índice apoptótico (%)  |
|--------------------|-------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------|
| PVA                | 12                | 243±59,4 <sup>a</sup>        | 22,1 <sup>a</sup>       | 9,1±1,68 <sup>a</sup>  |
| PVP                | 11                | 237±38,4 <sup>a</sup>        | 18,2 <sup>a</sup>       | 7,7±0,84 <sup>a</sup>  |
| TCM                | 19                | 218±52,8 <sup>a</sup>        | 23,9 <sup>a</sup>       | 10,1±0,87 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup>Valores seguidos de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente. ANOVA; Teste de Tukey  $P<0,05$  \* Blastocistos eclodidos no dia 8 do desenvolvimento embrionário.

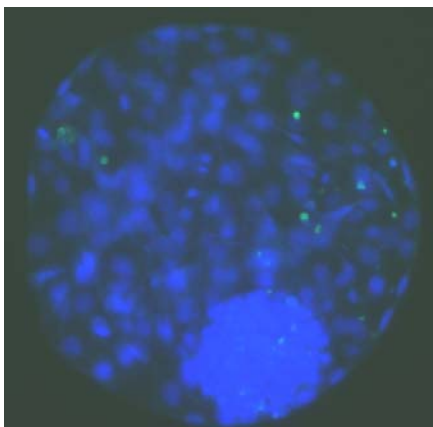


Figura 11. Detecção de fragmentação internucleossômica do DNA pela técnica de TUNEL em blastocisto bovino eclodido (D8); Tratamento 2 ( $\alpha$ -MEM +PVP-40).

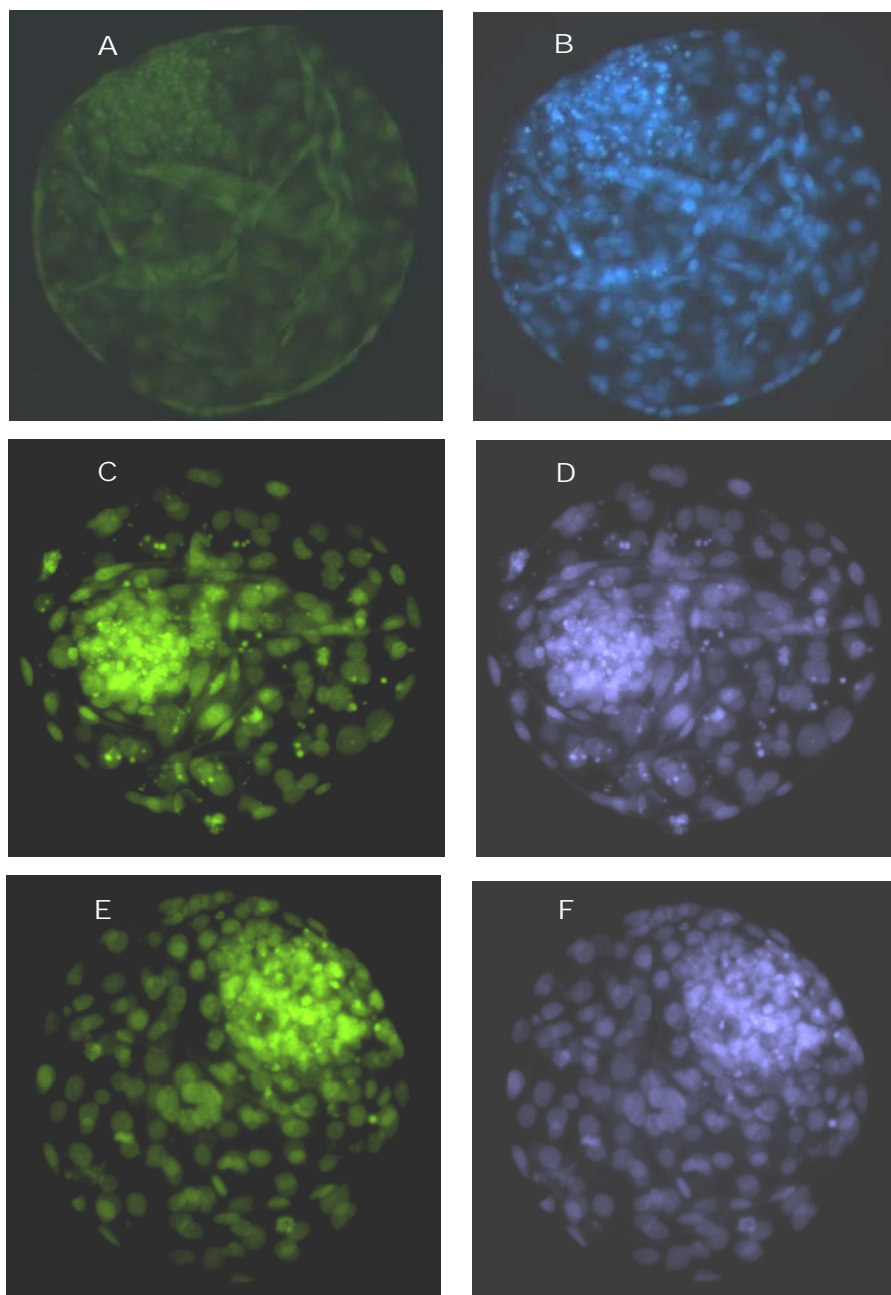


Figura 12. Detecção de fragmentação internucleossômica do DNA pela técnica de TUNEL em blastocistos bovinos eclodidos no D8 do cultivo. Na primeira coluna estão relacionadas as imagens com coloração pelo FITC (nucleotídeo marcado) e na segunda coluna a coloração pelo HOESCHT. A-B: controle negativo da reação de TUNEL. Blastocistos eclodidos derivados de oócitos maturados em meio TCM-199 (C-D) e em meio  $\alpha$ -MEM + PVP-40 (E-F).

## 6. DISCUSSÃO

A suplementação do meio de cultura com compostos biológicos tem demonstrado ser vantajosa para o desenvolvimento do embrião *in vitro*. O soro e a BSA são comumente utilizados como fonte protéica nos meios de cultura, porém podem influenciar positiva ou negativamente a maturação oocitária e posterior desenvolvimento embrionário (MCKIERNAN; BAVISTER, 1992; WANG et al., 1997; WANG et al., 2006; SAGIRKAYA et al., 2007). Com o objetivo de evitar interferências na repetibilidade de resultados e a contaminação biológica de embriões alguns estudos têm sido desenvolvidos empregando sistemas de cultura definidos.

De acordo com os resultados do presente estudo, oócitos bovinos maturados em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com IGF-I, insulina e macromoléculas sintéticas, sem gonadotrofinas e soro, alcançaram potencial para o desenvolvimento pré-implantação similar à oócitos maturados no meio TCM-199 suplementado com FSH e 10% de soro. Não foram observadas diferenças nos índices de embriões produzidos *in vitro*, mensurados pelas taxas de formação de blastocistos e eclosão, e nos parâmetros qualitativos avaliados, como a expressão dos genes Hsp-70 e Bax e os índices de apoptose das células embrionárias, entre o sistema de MIV quimicamente definido e o sistema suplementado com soro. Como observado por WATSON et al. (2000), condições sub-ótimas de cultura durante a MIV podem ser restritivas ao desenvolvimento. Estes resultados indicam que a supressão do soro e gonadotrofinas durante a MIV não compromete o desenvolvimento pós-clivagem do oócito. ALI e SIRARD (2002), demonstraram que a taxa de desenvolvimento de oócitos não suplementados com proteínas e hormônios durante a MIV é equivalente

ou superior aquela de oócitos maturados na presença de soro e hormônios como o FSH, LH e estradiol. Embora, no presente estudo, a taxa de clivagem tenha sido superior no grupo controle, os embriões derivados de oócitos maturados em sistema definido apresentaram a mesma proporção de embriões no estágio de 9-16 células após 68-72 hpi quando comparados ao meio de maturação contendo soro. Este período está associado com a transição materno-zigótica, quando a regulação epigenética da expressão do genoma embrionário é particularmente sensível aos fatores externos (TELFORD et al., 1990; DEAN et al., 2001). Portanto, é um período importante para a reprogramação da expressão gênica e o desenvolvimento subsequente (MEMILI; FIRST, 1999). A taxa de eclosão, baseada no número total de blastocistos também foi similar entre os embriões resultantes de oócitos cultivados em meio com ou sem soro e gonadotrofinas.

Inversamente ao cultivo em TCM com soro (SVE), não foi observada expansão do *cumulus oophorus* quando os oócitos foram cultivados em meio  $\alpha$ -MEM com PVA ou PVP, provavelmente devido à ausência de FSH, o principal fator regulador da secreção do ácido hialurônico nas CC (BUCCIONE et al., 1990; CHEN et al., 1994). Estes resultados confirmam os achados de ALI e SIRARD (2002) em meio SOF suplementado com PVP-40 e indicam que durante a MIV do oócito bovino a expansão do cumulus não está diretamente relacionada à expressão de competência citoplasmática (ALI; SIRARD, 2002).

A suplementação com IGF-I e insulina, em doses fisiológicas, estimulou a esteroidogênese das células do cumulus. Nossos resultados demonstram que CCOs bovinos cultivados em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com PVA ou PVP-40, sem a adição de gonadotrofinas e soro, secretam quantidades substanciais de progesterona e



estradiol durante a MIV. Neste sistema de MIV, as CC são responsivas a doses fisiológicas de IGF-I e insulina e a atividade de aromatase é mantida.

SPICER et al. (2002) reportam que a insulina e IGF-I regulam a atividade de aromatase em CG bovinas cultivadas, por meio de ação sinérgica com o FSH. Uma hipótese tem sido que estes peptídeos atuam como amplificadores das ações gonadotróficas no ovário (GUTIERREZ et al., 1997; SPICER et al., 2002). Nossos resultados demonstram que o IGF-I e insulina podem potencialmente estimular a P450arom em CC, na ausência de gonadotrofinas, o que está de acordo com dados obtidos por GUTIÉRREZ et al. (1997) em cultura de CG murais.

A atividade esteroidogênica das células do cumulus *in vitro* tem sido descrita como um marcador da viabilidade do CCO e do potencial de fertilização e desenvolvimento pós-clivagem do oócito (BAR-AMI et al., 1989; LUCIDI et al., 2003; THOMPSON, 2006). Embora, no sistema de MIV quimicamente definido, suplementado com PVA ou PVP-40, os oócitos tenham sido maturados em um meio com alta proporção E2:P4 não foi possível estabelecer neste estudo uma correlação entre o perfil esteroidogênico dos CCOs durante a MIV e o potencial do oócito para o desenvolvimento pré-implantacional. Como não foi avaliado o *time course* da secreção dos esteróides não foi possível estabelecer uma correlação entre o grau de maturidade do oócito e o perfil da secreção de E2. No entanto, tem sido observado, em experimentos em nosso laboratório que a secreção de E2 por CCOs bovinos maturados em meio definido atinge um platô com 14-16 horas e decresce até 24 horas de MIV (resultados não publicados). Embora o papel dos esteróides na maturação oocitária ainda não esteja estabelecido, a secreção de esteróides durante a MIV e a alta proporção E2:P4 observada podem ser indicativos de condições de

cultura mais fisiológicas, já que a atividade de aromatase é um marcador do status folicular *in vivo* (BAR-AMI et al., 1989; KEMPER GREEN et al., 1996; FORTUNE et al., 2001; IRVING-RODGERS et al., 2003; LUCIDI et al., 2003; THOMPSON, 2006) e que folículos dominantes apresentam alta relação E2:P4 no fluido folicular.

Há poucos relatos na literatura de estudos que avaliaram a esteroidogênese do CCOs bovinos durante a MIV e os resultados são conflitantes (MINGOTI et al., 2002; WANG et al., 2006; SCHOENFELTER et al., 2003). A produção de estradiol por CCOs bovinos maturados durante 24 horas em meio TCM-199 suplementado com BSA reportada por MINGOTI et al. (2002) foi de 128,5 ng/ml quando cultivados 10 CCOs/3 ml de meio de MIV, enquanto a concentração obtida por WANG et al. (2006) em TCM suplementado com soro, após 24h de MIV, foi de 140 ng/ml com a densidade de 5 COCs/100 µl de meio. Inversamente, nossos resultados demonstram pequena secreção de E2 (350 pg/ml/40 CCOs/400 µl) no meio TCM suplementado com 10% de soro. As razões para estas discrepâncias na secreção de E2 entre os estudos são desconhecidas, mas devem incluir diferenças metodológicas, como a densidade de CCOs por ml de meio, suplementos e/ou fonte de soro. Em adição, SCHUETZ et al. (1992) observaram que diferentes tipos de soro utilizados no cultivo *in vitro* de CCOs humanos variam marcadamente em seu conteúdo hormonal e podem afetar diferencialmente a secreção de hormônios pelos CCOs durante a cultura. Entretanto, nossos achados estão de acordo com as concentrações de P4 obtidas (20 a 30 ng/ml) nos estudos descritos acima.

Embora o estradiol seja rotineiramente adicionado ao meio de MIV em alguns protocolos experimentais, geralmente em doses farmacológicas, os efeitos deste esteróide na maturação do oócito permanecem controversos (ALI; SIRARD,

2002; BEKER et al., 2002; MOREIRA et al., 2002; LATTANZI et al., 2003; THOMPSON, 2006). Além disso, não está claro se a suplementação com estradiol exógeno é adequada e necessária para o cultivo do oócito, uma vez que a secreção deste esteróide tem sido demonstrada em culturas *in vitro* de CG murais e CC de várias espécies, como em humano (CHIAN et al., 1999; SCHUETZ et al., 1992), rato (SHERIZLY et al., 1980), bovino (MINGOTI et al., 2002; SCHOENFELTER et al., 2003), ovino (CAMPBELL et al., 1996) e suíno (CHANNING et al., 1981). Um papel estabelecido do estradiol é promover alterações na reatividade do sistema de liberação do cálcio durante a maturação citoplasmática do oócito (TESARIK; MENDOZA, 1997), permitindo a típica oscilação do cálcio durante a fertilização (HERBERT et al., 1997). Também foi descrito que o estradiol inibe a apoptose induzida por estresse oxidativo em células ovarianas (MURDOCH, 1998).

Além da atividade esteroidogênica das CC, o IGF-I e a insulina também estimularam a maturação oocitária na ausência de FSH, nos grupos PVA e PVP-40, o que demonstra a ação gonadotrófica destes fatores. De fato, vários estudos reportam que ambos, IGF-I e insulina, atuam na maturação *in vitro* de oócitos bovinos (MAKAREVICH; MARKKULA, 2002; SHIMIZU et al., 2007), suínos (SINGH; ARMSTRONG, 1997), ovinos (GULER et al., 2000), murinos (KIAPEKOU et al., 2005) e humanos (GOUD et al., 1998). Considerando a importância do FSH no desenvolvimento folicular, esta gonadotrofina é frequentemente empregada no meio de MIV na tentativa de tornar o processo de maturação mais efetivo. No entanto, estudos prévios não mostram efeito benéfico das gonadotrofinas, FSH e/ou LH, na MIV e desenvolvimento embrionário subsequente (OLSON SE, 1991; TROUNSON et al., 1994) e a suplementação do meio de cultura do oócito com gonadotrofinas

exógenas ainda é controversa (ALI; SIRARD, 2002; ALI et al., 2005). Como o estabelecimento da dominância folicular é coincidente com mudanças no sistema IGF-I/IGFBPs ovariano, com aumento na biodisponibilidade de IGF-I e menor dependência do FSH no folículo pré-ovulatório, é possível que esta gonadotrofina não seja obrigatória para o processo de maturação do oócito. No entanto, uma investigação mais detalhada é necessária para determinar o papel do IGF-I e insulina na maturação de oócitos bovinos.

O PVA e o PVP tem sido adicionados ao meio de cultura como substitutos de macromoléculas do soro (HIRAO et al., 2004) e da BSA durante a MIV do oócito bovino (WATSON et al., 2000; MIZUSHIMA; FUKUI, 2001; ALI; SIRARD, 2002; CHUNG et al., 2007). A suplementação protéica dos meios de cultura para a MIV normalmente é feita com soro, no entanto, além da variação na composição entre os lotes comercializados, há a possibilidade de introdução de contaminantes carregados pelo soro como esteróides, colesterol, peptídeos, antibióticos, proteases e agentes extrínsecos, como bactérias, vírus, anticorpos e prions nos sistemas de cultura (WANG et al., 1997; WANG et al., 2006; SAGIRKAYA et al., 2007). ALI e SIRARD (2002) reportam que a substituição do PVP-40 pelo PVA no meio de MIV decresceu o desenvolvimento embrionário, particularmente nos estádios de mórula e blastocisto. PINYOPUMMINTR e BAVISTER (1991) também demonstraram que o desenvolvimento embrionário pós-clivagem foi reduzido quando a BSA ou soro foram substituídos pelo PVA. No entanto, no presente estudo não observamos efeitos distintos da suplementação dos meios de MIV com PVA ou o PVP-40 nas taxas de blastocistos e eclosão. A suplementação do meio  $\alpha$ -MEM com PVA ou PVP-40 também não influenciou

distintamente a proporção E2:P4 secretados pelas CC e nem a maturação do oócito, observamos apenas uma discreta redução na produção de progesterona no meio de cultura suplementado com o PVP-40. É possível que no meio  $\alpha$ -MEM o PVP-40 e o PVA tenham a mesma biofuncionalidade.

Quanto à expressão gênica, não foram observadas diferenças na abundância relativa dos transcritos dos genes Hsp-70 e Bax nos grupos de blastocistos produzidos nos três sistemas de MIV avaliados neste estudo. A expressão de genes relacionados à resposta celular ao estresse tais como o Hsp e o Bax, pode ser alterada durante o cultivo do oócito e do embrião (WARZICH et al., 2007; WRENZYCKI et al., 2005). Portanto, a abundância relativa de transcritos destes genes pode ser um marcador das condições de cultura. O gene Hsp-70 é um modulador da resposta celular ao estresse térmico. As proteínas do choque térmico desempenham um papel protetor dentro da célula e exercem função anti-apoptótica (EDWARDS et al., 2001). O Bax é um gene pró-apoptótico e seu papel está associado à atividade do Bcl-2. A proporção das proteínas Bax:Bcl-2 pré-determina a resposta celular a um estímulo apoptótico (BASU; HALDAR, 1998). Tem sido sugerido que em condições de estresse pode haver uma interação na expressão dos genes Hsp-70 e Bax, com supressão da ativação do Bax em células com níveis elevados de Hsp-70 (WARZYCH et al., 2007).

Embora não tenha sido observada diferença estatística nos níveis de transcritos do gene Hsp-70 entre os grupos experimentais no presente estudo, alguns autores reportam *up-regulation* deste gene em embriões derivados de oócitos maturados no meio TCM-199 suplementado com 10% de soro em comparação com meios de maturação definidos, semi-definidos ou com menor porcentagem de soro

(RUSSEL et al., 2006, WRENZYCKI et al., 1999; WARZYCH et al., 2007). SAGIRKAYA et al. (2007) demonstraram que transcritos do gene Hsp-70 foram alterados em diferentes condições durante a MIV de oócitos bovinos em meio suplementado com soro fetal (FCS) ou o substituto sintético de soro (SSS). WARZYCH et al. (2007) sugerem que o soro presente no meio de cultura age como um fator estressor induzindo a expressão do gene Hsp-70. No entanto, há resultados conflitantes (KNIJN et al., 2002; WRENZYCKI et al., 2001) e ainda não foram comparados diferentes soros (SFB, SVE, etc) e a interferência de diferentes lotes nos resultados obtidos.

As suplementações do meio de MIV avaliadas neste trabalho também não afetaram a abundância relativa de transcritos do gene Bax nos blastocistos produzidos, embora não tenha sido avaliado o gene Bcl-2 e a proporção Bax:Bcl-2. Observamos uma tendência a *dow-regulation* deste gene em embriões resultantes de oócitos maturados no meio  $\alpha$ -MEM suplementado com PVA, porém, não foi detectada diferença estatística significativa neste experimento. WARZYCH et al. (2007) também não observaram alterações na abundância relativa de transcritos do gene Bax em oócitos e blastocistos no dia 9 após a MIV com PVP-40, BSA ou SFB. *Up-regulation* do gene Bax em embriões produzidos *in vitro* tem sido descrita em diferentes estudos (RIZOS et al., 2002; LONERGAN, 2005). Contudo, dados sobre a influência da MIV na expressão do gene Bax em embriões bovinos são escassos. WARZYCH et al. (2007) publicaram pela primeira vez dados sobre a expressão deste gene em embriões resultantes de oócitos maturados em diferentes condições de cultura.

Além das diferenças nos padrões de expressão gênica, uma das alterações mais frequentes encontradas durante o desenvolvimento inicial do embrião está relacionada com a fragmentação nuclear atribuída ao processo apoptótico, que ocorre principalmente nas células que formam a MCI. Acredita-se que o objetivo deste mecanismo seja eliminar células anormais, que impeçam o potencial de desenvolvimento do trofotoderma e que possam ser letais para o embrião (HARDY, 1997). Contudo, um número considerado mínimo de células saudáveis da MCI é necessário para que o desenvolvimento prossiga (HARDY et al., 1989; HARDY, 1997; HARDY et al., 2003). Em embriões murinos e humanos, aproximadamente 15 a 50% das células morrem durante o período de pré-implantação por mecanismos ainda pouco elucidados. A sobrevivência dos embriões no período de pré-implantação depende da avaliação de parâmetros como a taxa de desenvolvimento e grau de fragmentação nuclear. Um rápido crescimento e um baixo grau de fragmentação proporcionam maiores chances de sobrevivência embrionária (WARNER et al., 1998). No presente estudo, tais parâmetros não foram comprometidos ou alterados em embriões derivados de oócitos maturados em meio definido suplementado com PVA ou PVP-40 em comparação com meio indefinido (TCM-199 + soro). Contudo, houve uma tendência à redução do índice apoptótico em embriões do grupo  $\alpha$ -MEM + PVA, provavelmente não detectada na análise estatística em função do número amostral.

## 7. CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados deste estudo indicam que oócitos bovinos podem ser maturados em meio livre de soro e gonadotrofinas, suplementado com PVA ou PVP-40 e fatores de crescimento, sem alterar o desenvolvimento pós-clivagem, a expressão relativa dos genes associados ao estresse térmico e à indução de apoptose. Também, não houve aumento do índice apoptótico ou redução do número de células totais em embriões derivados de oócitos maturados neste sistema. A manutenção da atividade de aromatase e produção de estradiol pelas células do cumulus durante o cultivo no sistema de MIV definido e a alta relação E2:P4, característica da fase folicular do ciclo, podem ser indicativas de condições de cultura mais fisiológicas. No entanto, outras avaliações, como o desenvolvimento pós-implantação, serão necessárias para confirmar essa hipótese.



## 8. REFERÊNCIAS

ADASHI, E.Y. The ovarian follicle: life cycle of a pelvic clock. In: E. Y. ADASHI, ROCK, J. A., ROSENWAKS ZEN (Ed.). Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology, 1996. The ovarian follicle: life cycle of a pelvic clock., p.212-229

AKTAS, H. et al. Meiotic state of bovine oocytes is regulated by interactions between cAMP, cumulus, and granulosa. **Mol Reprod Dev**, v.65, n.3, Jul, p.336-43. 2003.

AL-KATANANI, Y.M. , HANSEN, P.J. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. **Mol Reprod Dev**, v.62, n.2, Jun, p.174-80. 2002.

ALI, A. et al. Origin of bovine follicular fluid and its effect during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.62, n.9, Dec, p.1596-606. 2004.

ALI, A. et al. The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. **Mol Reprod Dev** v.71, n.3, p.358-367. 2005.

ALI, A. , SIRARD, M.A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. **Biol Reprod**, v.66, n.4, Apr, p.901-5. 2002.

ALI, A. , SIRARD, M.A. Protein kinases influence bovine oocyte competence during short-term treatment with recombinant human follicle stimulating hormone. **Reproduction**, v.130, n.3, Sep, p.303-10. 2005.

ANDERIESZ, C. et al. Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development in vitro. **Hum Reprod**, v.15, n.5, May, p.1140-8. 2000.

BACHVAROVA, R. , MOY, K. Autoradiographic studies on the distribution of labeled maternal RNA in early mouse embryos. **J Exp Zool**, v.233, n.3, Mar, p.397-403. 1985.

BAO, B. et al. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. **Biol Reprod**, v.56, n.5, May, p.1158-68. 1997.

BAR-AMI, S. et al. Different morphological and steroidogenic patterns in oocyte/cumulus-corona cell complexes aspirated at in vitro fertilization. **Biol Reprod**, v.41, n.4, Oct, p.761-70. 1989.

BASU, A. , HALDAR, S. The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. **Mol Hum Reprod**, v.4, n.12, Dec, p.1099-109. 1998.

BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Hum Reprod Update**, v.1, n.2, Mar, p.91-148. 1995.

BEKER-VAN WOUDEBERG, A.R. et al. Developmental competence of bovine oocytes after specific inhibition of MPF kinase activity: effect of estradiol supplementation and follicle size. **Anim Reprod Sci**, v.92, n.3-4, May, p.231-40. 2006.

BEKER, A.R. et al. Effect of 17beta-estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.58, n.9, Dec, p.1663-73. 2002.

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

BLONDIN, P. et al. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. **Theriogenology**, v.48, n.5, Oct 1, p.803-13. 1997.

BOELHAUVE, M. et al. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. **Biol Reprod**, v.73, n.4, Oct, p.737-44. 2005.

BREVINI-GANDOLFI, T.A. et al. Changes in poly(A) tail length of maternal transcripts during in vitro maturation of bovine oocytes and their relation with developmental competence. **Mol Reprod Dev**, v.52, n.4, Apr, p.427-33. 1999.

BROWN, D.G. et al. Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. **J Biol Chem**, v.268, n.5, Feb 15, p.3037-9. 1993.

BUCCIONE, R. et al. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. **Dev Biol**, v.138, n.1, Mar, p.16-25. 1990.

BYRNE, A.T. et al. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **J Reprod Fertil**, v.117, n.1, Sep, p.97-105. 1999.

BYRNE, A.T. et al. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. **Mol Reprod Dev**, v.62, n.4, Aug, p.489-95. 2002.

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

CAMARGO, L.S. et al. Developmental competence of oocytes from prepubertal *Bos indicus* crossbred cattle. **Anim Reprod Sci**, v.85, n.1-2, Jan, p.53-9. 2005.

CAMPBELL, B.K. et al. Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. **J Reprod Fertil**, v.106, n.1, Jan, p.7-16. 1996.

CHANNING, C.P. et al. Porcine granulosa and cumulus cell properties. LH/hCG receptors, ability to secrete progesterone and ability to respond to LH. **Mol Cell Endocrinol**, v.22, n.3, Jun, p.359-70. 1981.

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

CHEN, L. et al. Sequential effects of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on mouse cumulus expansion in vitro. **Biol Reprod**, v.51, n.2, Aug, p.290-5. 1994.

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

CHIAN, R.C. et al. Production of steroids from human cumulus cells treated with different concentrations of gonadotropins during culture in vitro. **Fertil Steril**, v.71, n.1, Jan, p.61-6. 1999.

CHIAN, R.C. et al. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes in vitro. **Theriogenology**, v.41, n.7, p.1499-508. 1994.

CHOI, Y.H. et al. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. **Theriogenology**, v.56, n.4, Sep 1, p.661-70. 2001.

CHUNG, J.T. et al. Effect of polyvinylpyrrolidone on bovine oocyte maturation in vitro and subsequent fertilization and embryonic development. **Reprod Biomed Online**, v.15, n.2, Aug, p.198-207. 2007.

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

COHEN, J.J. Apoptosis and its regulation. **Adv Exp Med Biol**, v.406, p.11-20. 1996.

COLEMAN, N.V. et al. In vitro maturation and early developmental capacity of bovine oocytes cultured in pure follicular fluid and supplementation with follicular wall. **Theriogenology**, v.67, n.5, Mar 15, p.1053-9. 2007.

CUI, X.S. et al. Fetal bovine serum influences apoptosis and apoptosis-related gene expression in porcine parthenotes developing in vitro. **Reproduction**, v.127, n.1, Jan, p.125-30. 2004.

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

DEAN, W. et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, n.24, Nov 20, p.13734-8. 2001.

DODE, M.A. , GRAVES, C. Involvement of steroid hormones on in vitro maturation of pig oocytes. **Theriogenology**, v.57, n.2, Jan 15, p.811-21. 2002.

DOWNS, S.M. et al. The meiotic response of cumulus cell-enclosed mouse oocytes to follicle-stimulating hormone in the presence of different macromolecules. **J Exp Zool**, v.258, n.3, Jun, p.373-83. 1991.

DUNNE, L.D. et al. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. **Anim Reprod Sci**, v.58, n.1-2, Feb 28, p.39-44. 2000.

DURANTHON, V. , RENARD, J.P. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. **Theriogenology**, v.55, n.6, Apr 1, p.1277-89. 2001.

EDWARDS, J.L. et al. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione. **Theriogenology**, v.55, n.1, Jan 1, p.209-23. 2001.

EXLEY, G.E. et al. Expression of caspase and BCL-2 apoptotic family members in mouse preimplantation embryos. **Biol Reprod**, v.61, n.1, Jul, p.231-9. 1999.

FORTUNE, J.E. et al. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biol Reprod**, v.65, n.3, Sep, p.648-54. 2001.

FREI, R.E. et al. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow. **J Reprod Fertil**, v.86, n.2, Jul, p.637-41. 1989.

FULOP, C. et al. Coding sequence of a hyaluronan synthase homologue expressed during expansion of the mouse cumulus-oocyte complex. **Arch Biochem Biophys**, v.337, n.2, Jan 15, p.261-6. 1997.

GANDHI, A.P. et al. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. **Reprod Nutr Dev**, v.34, n.4, p.329-339. 1994.

GARDNER, D.K. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. **Cell Biol Int**, v.18, n.12, Dec, p.1163-79. 1994.

GAVRIELI, Y. et al. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol**, v.119, n.3, Nov, p.493-501. 1992.

GEORGOPOULOS, C. , WELCH, W.J. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. **Annu Rev Cell Biol**, v.9, p.601-34. 1993.

GORE-LANGTON, R.E., ARMSTRONG, D.T. Follicular steroidogenesis and its control. In: E. KNOBIL, NEILL, J.D. (Ed.). The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press, 1994. Follicular steroidogenesis and its control, p.571-627

GRAY, C.W. et al. Purification of an embryotrophic factor from commercial bovine serum albumin and its identification as citrate. **J Reprod Fertil**, v.94, n.2, Mar, p.471-80. 1992.

GRAZUL-BILSKA, A.T. et al. Gap junctions in the ovaries. **Biol Reprod**, v.57, n.5, Nov, p.947-57. 1997.

GULER, A. et al. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. **Theriogenology**, v.54, n.2, Jul 15, p.209-18. 2000.

GUTIERREZ-ADAN, A. et al. Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro. **Mol Reprod Dev**, v.68, n.4, Aug, p.441-8. 2004.

GUTIERREZ, C.G. et al. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. **Biol Reprod**, v.56, n.3, Mar, p.608-16. 1997.

HANDYSIDE, A.H. , HUNTER, S. A rapid procedure for visualising the inner cell mass and trophectoderm nuclei of mouse blastocysts in situ using polynucleotide-specific fluorochromes. **J Exp Zool**, v.231, n.3, Sep, p.429-34. 1984.

HARDY, K. Cell death in the mammalian blastocyst. **Mol Hum Reprod**, v.3, n.10, Oct, p.919-25. 1997.

HARDY, K. et al. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. **Development**, v.107, n.3, Nov, p.597-604. 1989.

HARDY, K. et al. Maintenance of the inner cell mass in human blastocysts from fragmented embryos. **Biol Reprod**, v.68, n.4, Apr, p.1165-9. 2003.

HARMAN, S.M. et al. Interaction of estrogen and gonadotrophins on follicular atresia. **Endocrinology**, v.96, n.5, May, p.1145-52. 1975.

HERBERT, M. et al. Development of calcium signalling mechanisms during maturation of human oocytes. **Mol Hum Reprod**, v.3, n.11, Nov, p.965-73. 1997.

HIRAO, Y. et al. In vitro growth and development of bovine oocyte-granulosa cell complexes on the flat substratum: effects of high polyvinylpyrrolidone concentration in culture medium. **Biol Reprod**, v.70, n.1, Jan, p.83-91. 2004.

HSUEH, A.J. et al. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. **Endocr Rev**, v.15, n.6, Dec, p.707-24. 1994.

HU, X. et al. Expression and redistribution of cellular Bad, Bax, and Bcl-X(L) protein is associated with VCD-induced ovotoxicity in rats. **Biol Reprod**, v.65, n.5, Nov, p.1489-95. 2001.

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

IRVING-RODGERS, H.F. et al. Cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression and the concentrations of steroid hormones in the follicular fluids of different phenotypes of healthy and atretic bovine ovarian follicles. **Biol Reprod**, v.69, n.6, Dec, p.2022-8. 2003.

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

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

JURISICOVA, A. et al. Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. **Mol Reprod Dev**, v.51, n.3, Nov, p.243-53. 1998.

JURISICOVA, A. et al. Programmed cell death and human embryo fragmentation. **Mol Hum Reprod**, v.2, n.2, Feb, p.93-8. 1996.

KEMPER GREEN, C.N. et al. Temporal aspects of ovarian follicular growth and steroidogenesis following exogenous follicle-stimulating hormone in Angus heifers. **Anim Reprod Sci**, v.45, n.3, Dec 16, p.157-76. 1996.

KERR, J.F. et al. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v.73, n.8, Apr 15, p.2013-26. 1994.

KERR, J.F. et al. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v.26, n.4, Aug, p.239-57. 1972.

KESKINTEPE, L. , BRACKETT, B.G. In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. **Biol Reprod**, v.55, n.2, Aug, p.333-9. 1996.

KIAPEKOU, E. et al. Effects of GH and IGF-I on the in vitro maturation of mouse oocytes. **Hormones (Athens)**, v.4, n.3, Jul-Sep, p.155-60. 2005.

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

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

KNIJN, H.M. et al. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo. **Reproduction**, v.124, n.3, Sep, p.365-75. 2002.

KRUIP, T.A.M. et al. The effect of oestradiol-17 $\beta$  on nuclear maturation of bovine oocytes. Proceedings of the Eleventh International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination. Dublin, 1988. 336 p.

LATTANZI, M.L. et al. Exposure of bovine oocytes to the endogenous metabolite 2-methoxyestradiol during in vitro maturation inhibits early embryonic development. **Biol Reprod**, v.69, n.6, Dec, p.1793-800. 2003.

LEVY, R. Genetic regulation of preimplantation embryo survival. **Int Rev Cytol**, v.210, p.1-37. 2001.

LI, W.X. et al. Apoptosis in heat-induced cell killing: the protective role of hsp-70 and the sensitization effect of the c-myc gene. **Radiat Res**, v.145, n.3, Mar, p.324-30. 1996.

LIU, X. et al. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. **Cell**, v.89, n.2, Apr 18, p.175-84. 1997.

LOEWENSTEIN, W.R. The cell-to-cell channel of gap junctions. **Cell**, v.48, n.5, Mar 13, p.725-6. 1987.

LONERGAN, P. Predicting embryo quality: mRNA expression and the preimplantation embryo. **Reproductive Biomedicine Online** v.11, n.3, p.340-348. 2005.

LONERGAN, P. et al. Development of bovine embryos in vitro following oocyte maturation under defined conditions. **Reprod Nutr Dev**, v.34, n.4, p.329-39. 1994.

LONERGAN, P., FAIR, T, GORDON, I. Effect of time of transfer to granulosa cell monolayer and cell-stage at 48 hours post-insemination on bovine oocyte development following IVM/IVF/IVC. Proceedings of the Eighth Conference of European Embryo Transfer Association. Lyon, 1992. 178 p.

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

LONERGAN, P. et al. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression - experience from animal studies. **Reprod Biomed Online**, v.7, n.6, Dec, p.657-63. 2003.

LOPATA, A. , HAY, D.L. The potential of early human embryos to form blastocysts, hatch from their zona and secrete HCG in culture. **Hum Reprod**, v.4, n.8 Suppl, Nov, p.87-94. 1989.

LUCIDI, P. et al. Cumulus cells steroidogenesis is influenced by the degree of oocyte maturation. **Reprod Biol Endocrinol**, v.1, May 28, p.45. 2003.

LUSSIER, J.G. et al. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **J Reprod Fertil**, v.81, n.2, Nov, p.301-7. 1987.

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

MAKAREVICH, A.V. , MARKKULA, M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. **Biol Reprod**, v.66, n.2, Feb, p.386-92. 2002.

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

MATIKAINEN, T. et al. Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. **Nat Genet**, v.28, n.4, Aug, p.355-60. 2001.



MATSUDO, T. et al. Complex formation of protein with different water-soluble synthetic polymers. **Biomacromolecules**, v.4, n.6, Nov-Dec, p.1794-9. 2003.

MCKIERNAN, S.H. , BAVISTER, B.D. Different lots of bovine serum albumin inhibit or stimulate in vitro development of hamster embryos. **In Vitro Cell Dev Biol**, v.28A, n.3 Pt 1, Mar, p.154-6. 1992.

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

MEIRELLES, F.V. et al. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Anim Reprod Sci**, v.82-83, Jul, p.13-20. 2004.

MEMILI, E. , FIRST, N.L. Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. **Biol Reprod**, v.61, n.5, Nov, p.1198-207. 1999.

MINGOTI, G.Z. et al. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids. **Anim Reprod Sci**, v.69, n.3-4, Feb 15, p.175-86. 2002.

MIZUSHIMA, S. , FUKUI, Y. Fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined maturation medium. **Theriogenology**, v.55, n.7, Apr 15, p.1431-45. 2001.

MONAGHAN, P. et al. The effect of maturation time on the subsequent in vitro development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.39, p.370. 1993.

MONGET, P. , MONNIAUX, D. [Role of IGF system in the ovary]. **Contracept Fertil Sex**, v.22, n.9, Sep, p.556-63. 1994.

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

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

MOREIRA, F. et al. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. **Theriogenology**, v.57, n.2, Jan 15, p.895-907. 2002.

MORITA, Y. , TILLY, J.L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. **Dev Biol**, v.213, n.1, Sep 1, p.1-17. 1999.

MORRISON, T. et al. Nongenomic action of progesterone: activation of *Xenopus* oocyte phospholipase C through a plasma membrane-associated tyrosine kinase. **Endocrinology**, v.141, n.6, Jun, p.2145-52. 2000.

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

NAGAHAMA, Y. , ADACHI, S. Identification of maturation-inducing steroid in a teleost, the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). **Dev Biol**, v.109, n.2, Jun, p.428-35. 1985.

NAGATA, S. Apoptotic DNA fragmentation. **Exp Cell Res**, v.256, n.1, Apr 10, p.12-8. 2000.

NEUBER, E. et al. Analysis of DNA fragmentation of in vitro cultured bovine blastocysts using TUNEL. **Theriogenology**, v.57, n.9, Jun, p.2193-202. 2002.

NEUER, A. et al. Monoclonal antibodies to mammalian heat shock proteins impair mouse embryo development in vitro. **Hum Reprod**, v.13, n.4, Apr, p.987-90. 1998.

NEUER, A. et al. The role of heat shock proteins in reproduction. **Hum Reprod Update**, v.6, n.2, Mar-Apr, p.149-59. 2000.

NIEMANN, H. , WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, v.53, n.1, Jan 1, p.21-34. 2000.

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

OLSON SE, T.W., SEIDEL GE. Effects of gonadotropins during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryonic development. **Theriogenology**, v.35, p.250. 1991.

OTSUKA, Y. et al. Localization and gene expression of steroid sulfatase by RT-PCR in cumulus cells and relationship to serum FSH levels observed during in vitro fertilization. **J Exp Clin Assist Reprod**, v.2, n.1, Apr 11, p.6. 2005.

PARK, M. et al. Preservation of fertility and the impact of subsequent pregnancy in patients with premenopausal breast cancer. **Semin Oncol**, v.33, n.6, Dec, p.664-71. 2006.

PARRISH, J., FOOTE H. . In vitro fertilization of bovine oocytes using heparin treated and swim up separated frozen thawed semen is repeatable and result in high frequency of fertilization. **Theriogenology**, v.23, p.216. 1985.

PARRISH, J.J. et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biol Reprod**, v.38, n.5, Jun, p.1171-80. 1988.

PAULA-LOPES, F.F. , HANSEN, P.J. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochem Biophys Res Commun**, v.295, n.1, Jul 5, p.37-42. 2002.

PAVLOK, A. et al. Simulation of intrafollicular conditions prevents GVBD in bovine oocytes: a better alternative to affect their developmental capacity after two-step culture. **Mol Reprod Dev**, v.71, n.2, Jun, p.197-208. 2005.

PELUSO, J.J. , PAPPALARDO, A. Progesterone and cell-cell adhesion interact to regulate rat granulosa cell apoptosis. **Biochem Cell Biol**, v.72, n.11-12, Nov-Dec, p.547-51. 1994.

PEREZ, G.I. et al. Fragmentation and death (a.k.a. apoptosis) of ovulated oocytes. **Mol Hum Reprod**, v.5, n.5, May, p.414-20. 1999.

PEREZ, G.I. , TILLY, J.L. Cumulus cells are required for the increased apoptotic potential in oocytes of aged mice. **Hum Reprod**, v.12, n.12, Dec, p.2781-3. 1997.

PICTON, H. et al. The molecular basis of oocyte growth and development. **Mol Cell Endocrinol**, v.145, n.1-2, Oct 25, p.27-37. 1998.

PINYOPUMMINTR, T. , BAVISTER, B.D. In vitro-matured/in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. **Biol Reprod**, v.45, n.5, Nov, p.736-42. 1991.

PULKKI, A.S. , VOIPIO-PULKKI, L.M. Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy. **Circulation**, v.101. 2000.

RICHARDS, J.S. et al. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. **Recent Prog Horm Res**, v.57, p.195-220. 2002.

RIZOS, D. et al. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biol Reprod**, v.66, n.3, Mar, p.589-95. 2002.

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

ROTH, Z. , HANSEN, P.J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biol Reprod**, v.71, n.6, Dec, p.1898-906. 2004.

ROUDEBUSH, W.E. et al. Alpha-minimum essential medium (MEM) enhances in vitro hatched blastocyst development and cell number per embryo over Ham's F-10. **J Assist Reprod Genet**, v.11, n.4, Apr, p.203-7. 1994.

RUSSELL, D.F. et al. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Mol Reprod Dev**, v.73, n.10, Oct, p.1255-70. 2006.

SADLER, S.E. , MALLER, J.L. Identification of a steroid receptor on the surface of *Xenopus* oocytes by photoaffinity labeling. **J Biol Chem**, v.257, n.1, Jan 10, p.355-61. 1982.

SAGIRKAYA, H. et al. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. **Anim Reprod Sci**, v.101, n.3-4, Oct, p.225-40. 2007.

SALVESEN, G.S. , DIXIT, V.M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. **Cell**, v.91, n.4, Nov 14, p.443-6. 1997.

SCHOENFELDER, M. et al. Steroidogenesis during in vitro maturation of bovine cumulus oocyte complexes and possible effects of tri-butyltin on granulosa cells. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.84, n.2-3, Feb, p.291-300. 2003.

SCHUETZ, A.W. et al. Effects of human serum on rat cumulus-oocyte complex functions in vitro: oocyte activation and endocrine secretions. **J Assist Reprod Genet**, v.9, n.2, Apr, p.133-8. 1992.

SHERIZLY, I. , KRAICER, P.F. Progesterone secretion by the postovulatory rat cumulus. **Gamete Res** v.3, p.115-119. 1980.

SHIMADA, M. et al. Dynamic changes of connexin-43, gap junctional protein, in outer layers of cumulus cells are regulated by PKC and PI 3-kinase during meiotic resumption in porcine oocytes. **Biol Reprod**, v.64, n.4, Apr, p.1255-63. 2001.

SHIMIZU, T. et al. Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. **Anim Reprod Sci**, Apr 18. 2007.

SINGH, B. , ARMSTRONG, D.T. Insulin-like growth factor-1, a component of serum that enables porcine cumulus cells to expand in response to follicle-stimulating hormone in vitro. **Biol Reprod**, v.56, n.6, Jun, p.1370-5. 1997.

SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v.55, n.6, Apr 1, p.1241-54. 2001.

SIRARD, M.A. , BILODEAU, S. Effects of granulosa cell co-culture on in-vitro meiotic resumption of bovine oocytes. **J Reprod Fertil**, v.89, n.2, Jul, p.459-65. 1990.

SIRARD, M.A. , COENEN, K. The co-culture of cumulus-enclosed bovine oocytes and hemi-sections of follicles: Effects on meiotic resumption. **Theriogenology**, v.40, n.5, Nov, p.933-42. 1993.

SIRISATHIEN, S. , BRACKETT, B.G. TUNEL analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-I. **Mol Reprod Dev**, v.65, n.1, May, p.51-6. 2003.

SMAILI, S.S. et al. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. **Braz J Med Biol Res**, v.36, n.2, Feb, p.183-90. 2003.

SPANOS, S. et al. Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. **Biol Reprod**, v.63, n.5, Nov, p.1413-20. 2000.

SPICER, A.P. et al. Molecular cloning and characterization of a putative mouse hyaluronan synthase. **J Biol Chem**, v.271, n.38, Sep 20, p.23400-6. 1996.

SPICER, J.L. et al. Influence of gonadotropins on insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. **Dom Anim Endocrinol** v.22, p.237-254. 2002.

STOCCO, D.M. A StAR search: implications in controlling steroidogenesis. **Biol Reprod**, v.56, n.2, Feb, p.328-36. 1997.

SUTOVSKY, P. et al. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during in vitro culture of cattle oocyte cumulus complexes. **Biol Reprod**, v.49, n.6, Dec, p.1277-87. 1993.

TAKASE, K. et al. Apoptosis in the degeneration process of unfertilized mouse ova. **Tohoku J Exp Med**, v.175, n.1, Jan, p.69-76. 1995.

TATEMOTO, H. et al. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells. **Biol Reprod**, v.63, n.3, Sep, p.805-10. 2000.

TELFORD, N.A. et al. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Mol Reprod Dev**, v.26, n.1, May, p.90-100. 1990.

TESARIK, J. , MENDOZA, C. Direct non-genomic effects of follicular steroids on maturing human oocytes: oestrogen versus androgen antagonism. **Hum Reprod Update**, v.3, n.2, Mar-Apr, p.95-100. 1997.

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

THOMPSON, E.B. Mechanisms of T-cell Apoptosis Induced by Glucocorticoids. **Trends Endocrinol Metab**, v.10, n.9, Nov, p.353-358. 1999.

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

THULASIRAMAN, V. et al. Evidence that Hsc70 negatively modulates the activation of the heme-regulated eIF-2alpha kinase in rabbit reticulocyte lysate. **Eur J Biochem**, v.255, n.3, Aug 1, p.552-62. 1998.

TILLY, J.L. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.2, n.11, Nov, p.838-48. 2001.

TROUNSON, A. et al. Current status of IVM/IVF and embryo culture in humans and farm animals. **Theriogenology**, v.42, p.57-56. 1994.

VALDIMARSSON, G. et al. Coexpression of gap junction proteins in the cumulus-oocyte complex. **Mol Reprod Dev**, v.36, n.1, Sep, p.7-15. 1993.

VAN BLERKOM, J. , DAVIS, P.W. DNA strand breaks and phosphatidylserine redistribution in newly ovulated and cultured mouse and human oocytes: occurrence and relationship to apoptosis. **Hum Reprod**, v.13, n.5, May, p.1317-24. 1998.

VANDERHYDEN, B.C. et al. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis. **Endocrinology**, v.133, n.1, Jul, p.423-6. 1993.

VIUFF, D. et al. Chromosomal abnormalities and developmental kinetics in in vivo-developed cattle embryos at days 2 to 5 after ovulation. **Biol Reprod**, v.65, n.1, Jul, p.204-8. 2001.

WANG, H.F. et al. Studies of the role of steroid hormone in the regulation of oocyte maturation in cattle. **Reprod Biol Endocrinol**, v.4, p.4. 2006.

WANG, W.H. et al. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by in vitro fertilization. **J Reprod Fertil**, v.111, n.1, Sep, p.101-8. 1997.

WANG, Y.X. et al. Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility. **Pharm Res**, v.21, n.8, Aug, p.1362-73. 2004.

WARNER, C.M. et al. Genetic regulation of preimplantation mouse embryo survival. **J Exp Zool**, v.282, n.1-2, Sep-Oct 1, p.272-9. 1998.

WARZYCH, E. et al. Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced in vitro. **Mol Reprod Dev**, v.74, n.3, Mar, p.280-9. 2007.

WASIELAK, M. , BOGACKI, M. Apoptosis inhibition by insulin-like growth factor (IGF)-I during in vitro maturation of bovine oocytes. **J Reprod Dev**, v.53, n.2, Apr, p.419-26. 2007.

WATANABE, K. , YAMAGUCHI, Y. Molecular identification of a putative human hyaluronan synthase. **J Biol Chem**, v.271, n.38, Sep 20, p.22945-8. 1996.

WATSON, A.J. et al. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biol Reprod**, v.62, n.2, Feb, p.355-64. 2000.

WRENZYCKI, C. et al. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. **Mol Reprod Dev**, v.53, n.1, May, p.8-18. 1999.

WRENZYCKI, C. et al. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. **Reprod Fertil Dev**, v.17, n.1-2, p.23-35. 2005.

WRIGHT, C.S. et al. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. **Hum Reprod**, v.14, n.6, Jun, p.1555-62. 1999.

WUN, W.S. et al. Minimum essential medium alpha (MEM) enhances assisted reproductive technology results. I. Mouse embryo study. **J Assist Reprod Genet**, v.11, n.6, Jul, p.303-7. 1994.

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

WYLLIE, A.H. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. **Cancer Metastasis Rev**, v.11, n.2, Sep, p.95-103. 1992.

YADAV, B.R. et al. Chromosome analysis of bovine oocytes cultured in vitro. **Genet Sci Evol** v.23, p.191-196. 1991.

YANG, M.Y. , RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Anim Reprod Sci**, v.70, n.3-4, Apr 15, p.159-69. 2002.

YUAN, Y.Q. et al. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. **Theriogenology**, v.59, n.7, Apr 1, p.1585-96. 2003.

YUAN, Y.Q. et al. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. **Theriogenology**, v.63, n.8, May, p.2147-63. 2005.

ZHENG, P. et al. 17Beta-estradiol and progesterone improve in-vitro cytoplasmic maturation of oocytes from unstimulated prepubertal and adult rhesus monkeys. **Hum Reprod**, v.18, n.10, Oct, p.2137-44. 2003.

ZHIVOTOVSKY, B. et al. Formation of 50 kbp chromatin fragments in isolated liver nuclei is mediated by protease and endonuclease activation. **FEBS Lett**, v.351, n.2, Sep 5, p.150-4. 1994.

ZUELKE, K.A. , BRACKETT, B.G. Luteinizing hormone-enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. **Biol Reprod**, v.43, n.5, Nov, p.784-7. 1990.



## ANEXOS

### MANUSCRITO 1

PREIMPLANTATION DEVELOPMENT AND EXPRESSION OF HSP-70 AND BAX GENES IN BOVINE BLASTOCYSTS DERIVED FROM OOCYTES MATURED IN MEM-ALFA MEDIUM SUPPLEMENTED WITH GROWTH FACTORS AND SYNTHETIC MACROMOLECULES.

Enviado para publicação: **Theriogenology**

**Preimplantation development and expression of Hsp-70 and Bax genes in bovine blastocysts derived from oocytes matured in alpha-MEM supplemented with growth factors and synthetic macromolecules**

A.A. Vireque<sup>1</sup>, L.S.A. Camargo<sup>2</sup>, R.V. Serapião<sup>2</sup>, A.A.M. Rosa e Silva<sup>3</sup>, Y.F. Watanabe<sup>4</sup>, E. M. Ferreira<sup>1</sup>, P.A.A.S. Navarro<sup>1</sup>, W.P. Martins<sup>1</sup>, R.A. Ferriani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil;

<sup>2</sup>Embrapa Dairy Cattle, Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>3</sup>Department of Physiological Sciences, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

<sup>4</sup>Vitrogen Animal Reproduction, Cravinhos, SP, Brazil

Running title: Oocyte maturation in chemically defined medium.

<sup>1</sup>Corresponding author: +55 16 3421 8002; Fax: +55 16 3602 2231

e-mail address: [alessandra\\_vireque@yahoo.com.br](mailto:alessandra_vireque@yahoo.com.br)

**Abstract**

The culture environment affects both the maternal and embryonic expression of genes and is likely to alter both oocyte and embryo developmental competence. The search for better and less variable culture conditions simulating the *in vivo* environment has led to the development of defined culture media, with lower impact on the molecular reprogramming of oocytes and embryos. We evaluated embryo development and relative abundance (RA) of Hsp-70 and Bax transcripts in bovine blastocysts produced from oocytes matured in a chemically defined IVM system with synthetic polymers. Immature cumulus oocyte complexes (COCs) were matured for 22 to 24 h in alpha-MEM supplemented with IGF-1, insulin, 0.1% polyvinyl alcohol (PVA) or 0.1% polyvinylpyrrolidone (PVP) but without FSH or LH. The control group consisted of COCs matured in TCM plus FSH and 10% estrus cow serum. After fertilization, presumptive zygotes were co-cultured with cumulus cells until 224 h post-insemination. Total RNA was isolated from embryo pools, reverse transcribed into cDNA and subjected to transcript analysis by real-time PCR. Cleavage rate was higher ( $P < 0.05$ ) for the control group (68.3%) than for the PVA (54.4%) and PVP-40 (58.3%) groups. Nevertheless, there was no difference among the PVA, PVP-40 and control groups in blastocyst or hatching rates. Similarly, no difference in relative abundance of Hsp-70 and Bax transcripts was detected in comparison to the control group. These results show that bovine oocytes can be matured in serum- and gonadotrophin-free medium supplemented with PVA or PVP, enriched with IGF-I and insulin, without altering post-cleavage development and relative expression of some genes associated with stress and apoptosis.

**Keywords:** bovine oocytes; *in vitro* maturation; chemically defined medium; embryogenesis; Hsp-70 and Bax genes.

## 1- Introduction

The developmental competence of in vitro matured (IVM) oocytes is determined by factors such as regimes of hormonal stimulation, the follicle of origin, culture conditions and is associated with transcript accumulation during oocyte growth, which is important for initial development and for development up to the activation of the embryonic genome. Several supplements must be added to the IVM medium. Serum and bovine serum albumin (BSA) are commonly used as protein supplements to culture media for mammalian oocytes and embryos. However, these compounds may be contaminated with different molecules such as steroids, cholesterol, and peptides to which oocytes and embryos are not exposed *in vivo* [1], in addition to bacterial and viral agents [2-4]. Additionally, supplementation with serum can induce changes in transcription of genes related to development regardless of culture stage [5, 6]. Sagirkaya et al [2] demonstrated that the levels of certain transcripts were altered under different conditions during IVM of bovine oocytes in medium supplemented with fetal calf serum (FCS) or synthetic serum substitute (SSS). Changes in the level of maternal transcripts associated with supplementation of IVM medium were also observed by other investigators in bovine oocytes and embryos [6, 7].

Polyvinyl alcohol (PVA) and polyvinylpyrrolidone (PVP) are synthetic polymers with a molecular weight of 30,000 to 70,000 used in cell culture media for the stabilization of osmotic pressure and as surfactants and heavy metal chelating agents [8]. There is evidence that PVA and PVP-40 can replace proteins [9] in IVM of bovine oocytes without impairing the subsequent development [7, 10-14]. Previous studies have demonstrated that PVP is also beneficial for IVM and is associated with better embryo quality [15, 16]. Hormonal supplementation has been routinely used in IVM, although its use is still controversial, with wide variations among experimental protocols [17-20]. Some studies using defined culture media have demonstrated more clearly, without artifacts related to serum, the function of gonadotrophins and growth factors in oocyte maturation [9, 11, 21]. However, there is still no consensus about the most adequate supplementation. Several studies have reported that IGF-I and insulin positively affect the IVM of oocytes of different mammalian species [22-27]

and improve embryo quality. The establishment of culture systems that can mimic the conditions of *in vivo* oocyte maturation can prevent or minimize the interference of culture conditions with oocyte and embryo development. Thus, the objective of the present study was to investigate the influence of chemically defined IVM systems using alpha-MEM supplemented with IGF-I, insulin and different synthetic macromolecules (PVA and PVP-40) on the pre-implantation development and on the relative transcript level of the Hsp-70 and Bax genes in bovine embryos.

## **2- Materials and Methods**

### *2.1. Reagents and culture media for in vitro embryo production*

All the chemicals used during the study were from Sigma Chemical CO (St. Louis, MO) unless otherwise stated.

#### *2.1.1. Culture media for in vitro maturation*

Two basic culture media were used: A) minimum essential medium alpha (alpha-MEM, Invitrogen-Gibco BRL) supplemented with 0.1% PVA (Sigma) or PVP-40 (Sigma), 100 ng/ml bovine insulin (Sigma), 10 ng/ml human recombinant IGF-1 (Invitrogen),  $10^{-7}$  M androstenedione (Sigma), 11 mM nonessential amino acids (Gibco); 5 µg/ml human transferrin (Sigma), 1.4 ng/ml sodium selenium (Acros Organics), 10 mM sodium bicarbonate (Gibco), 0.02 M HEPES, and antibiotics (10,000 IU penicillin and 10,000 IU streptomycin (Sigma). B) TCM-199 (Invitrogen-Gibco BRL) supplemented with 10% estrus cow serum (ECS) inactivated at 56° C for 30 minutes and 20 µg/ml FSH (Folltropin- Vetrepharm Canada, London, ON, Canada) (control medium).

#### *2.1. Collection and in vitro maturation of bovine oocytes*

The ovaries were collected at a slaughterhouse and transported to the laboratory in 0.9% physiological saline supplemented with 0.05 g/L streptomycin at 33-37° C. The ovaries were washed in 0.9% physiological saline at 33 to 37° C and follicles

measuring 3 to 8 mm in diameter were aspirated with 21 G needles adapted to 20 ml syringes. Cumulus-oocyte complexes recovered from the follicular fluid were washed in TALP-HEPES medium [28] containing NaCl, KCl, NaHCO<sub>3</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na-lactate, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, HEPES, Pen-Strep, Na-pyruvate, and PVA or BSA (pH 7.4) and were evaluated morphologically under a stereoscopic microscope. Only oocytes with homogeneous cytoplasm and with more than three layers of granulosa cells were selected for the study.

### *2.1.1. Experimental design*

The pool of immature COCs selected for IVM was divided into three experimental groups: 1) alpha-MEM supplemented with IGF-1, insulin and 0.1% PVA 2) alpha-MEM supplemented with IGF-1, insulin and 0.1% PVP, or 3) TCM-199 containing FSH and ECS (control). The three oocyte groups were cultured for 22 to 24 hours in a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 38.5° C on 4-well NUNC plates containing 400 µl medium and 40 oocytes per well. Twelve replicates per treatment were performed.

### *2.2. In vitro embryo production*

Mature oocytes from the 3 treatments were inseminated with frozen-thawed, motile spermatozoa separated by swim-up [29] using Sperm TALP HEPES medium [28] supplemented with 6 mg/ml BSA fraction V. Fertilization was performed in 100 µl drops of Fert TALP medium [28] supplemented with 20 µg/ml heparin and 6 mg/ml fatty acid-free BSA fraction V under mineral oil. Sperm concentration during fertilization was approximately  $2 \times 10^6$  spermatozoa/ml and the spermatozoa were co-incubated with 20 COCs for 18 h in a humid 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 38.5° C. After fertilization, oocytes were partially denuded by pipetting in TALP HEPES medium [28] and 20 presumptive zygotes with up to 2 to 3 layers of cumulus cells were cultured in 50 µl drops of CR2aa medium [30] supplemented with 10% FCS (Invitrogen) and 1 mg/ml BSA under mineral oil in a humid 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 38.5° C. The culture medium was replaced by fresh medium every 48 hours.

Cleavage rate was evaluated 72 hours post-insemination (hpi), blastocyst rate was evaluated 168 to 192 hpi, and hatching rates at 224 hpi. Cleavage and blastocyst rates were calculated on the basis of number of presumptive zygotes and hatching rates were calculated from the number of blastocysts.

### 2.3. *RNA extraction, reverse transcription and amplification by real-time PCR*

Day 8 blastocysts from each group were removed from the culture drop, washed three times in TALP HEPES medium supplemented with BSA and divided into groups of 10 embryos each. The blastocysts were quickly frozen in liquid nitrogen, stored frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  and thawed for RNA extraction. Total RNA was extracted from pools of 10 embryos (three replicates) using the RNeasy Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and the first strand was synthesized using the Superscript<sup>TM</sup> III First Strand Synthesis kit (Invitrogen, Chicago, IL, USA). Relative quantitation was performed in duplicate using real-time PCR (ABI PRISM<sup>®</sup> 7000; Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). The reactions consisted of N iTaq<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix mixture with ROX (Bio-Rad, Waltham, MA, USA) containing cDNA equivalent to 0.8 blastocysts and specific gene primers (Table 1). The primers were designed using the Primer3 software [31]. The cDNA template was denatured at  $95^{\circ}\text{C}$  for 3 minutes followed by 40 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 seconds, annealing at a specific temperature for each primer for 15 seconds, and extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 45 seconds. After PCR, the melting curve was constructed for each sample to determine that a single specific product had been generated and the size of the amplicon was confirmed on 2% agarose gel stained with 2% ethidium bromide. Negative controls consisted of the PCR mix without nucleic acid. The transcript relative abundance of the H2a gene was used as endogenous reference. The Ct values of reference gene (H2a) among treatments had a coefficient of variance of 2.06%, with an average of  $30.27 \pm 0.62$ . Calculations of relative quantitation were performed by the comparative Ct method using the sample with the lowest value in the TCM-199 group as a control group. Data is reported as relative n-times difference in relation to the control sample.

## 2.5. Statistical analysis

Cleavage and 8 to 16 cell embryo at 72 hpi, and blastocyst rate were assessed by Chi-square. Hatching rates were evaluated by Fisher's exact test. Relative quantitation was evaluated by analysis of variance and the means was compared by the Student-Neuman-Keuls test. Data are reported as mean  $\pm$  SEM, with the level of significance set at  $P < 0.05$ .

## 3- Results

### 3.1. *In vitro* embryo production

A total of 1164 zygotes were obtained in 12 replicates. The total cleavage rate was higher ( $P < 0.05$ ) in the group with oocytes matured in TCM-119 medium with ECS (68,3%) than in the groups with oocytes matured in alpha-MEM supplemented with PVA (54,4%) and PVP (58,3%). However, the proportion of embryos  $> 8$  blastomeres was similar ( $P > 0.05$ ) for all groups, indicating that the rate of development during the first 72 hpi was similar for oocytes matured in chemically defined medium and for oocytes matured in medium containing serum. Similarly, maturation in alpha-MEM medium enriched with IGF-I/insulin and supplemented with PVA or PVP-40 in the absence of gonadotrophins and serum did not affect the rate of blastocysts produced or hatching rates ( $P > 0.05$ ) compared to maturation in TCM with ECS (Table 2).

### 3.2. Gene expression

Figure 1 illustrates the transcript relative abundance of the Hsp-70 and Bax genes determined by real-time PCR. The RA of Hsp-70 and Bax gene transcripts was similar for D8 blastocysts originating from all IVM groups. The results indicate that the conditions of oocyte culture in the IVM system with alpha-MEM supplemented with PVA or PVP, in the absence of serum and gonadotrophins, did not interfere with transcripts levels of these genes after embryo fertilization and culture compared to culture in TCM-199 supplemented with ECS.



#### 4- Discussion

The present study was carried out to assess the effect of IVM in a chemically defined medium (alpha-MEM) enriched with IGF-I/insulin and PVA or PVP in the absence of serum and gonadotrophins on the post-fertilization development of bovine oocytes. Oocytes matured under these culture conditions were found to have the same potential to transform into blastocyst as oocytes matured in standard, non-defined medium (TCM-199) supplemented with serum and FSH. This result indicates that suppression of serum and gonadotrophins during IVM does not compromise the post-cleavage development of the oocyte. Ali and Sirard [9] demonstrated that the rate of development of oocytes matured without proteins is equivalent or superior to that of oocytes matured in the presence of serum and hormones such as FSH, LH and estradiol. Although at the present study the cleavage rate was superior in the control group, the embryos derived from oocytes matured in a defined medium presented the same proportion of embryos in the 9 to 16 cell stage at 68 to 72 hpi compared to embryos derived from oocytes matured in the presence of serum. This stage is associated with maternal-embryonic transition, when the epigenetic regulation of the expression of the embryonic genome is particularly sensitive to external factors [32, 33]. The hatching rate, based on the total number of blastocysts, was also similar for embryos resulting from oocytes matured in medium with and without serum or gonadotrophins. In contrast to maturation in TCM with ECS, no expansion of cumulus cells was observed in alpha-MEM containing PVA or PVP, probably due to the absence of gonadotrophins that act on hyaluronic acid secretion [34-36]. The expansion of cumulus cells appear is not essential for the success of IVM, as also reported in other studies which observed that the expansion of these cells is not associated with cytoplasmic competence [9] or with the oocyte's ability to develop after fertilization [21].

Polyvinylalcohol and polyvinylpyrrolidone have been added to the medium as substitutes of serum [8] or BSA during IVM of bovine oocytes [7, 9-15]. Serum is commonly used as a protein source in culture media, but it may be contaminated with various defined and undefined molecules such as steroids, cholesterol, peptides, antibiotics, and proteases, and with extrinsic agents such as bacteria, viruses,

antibodies, and prions [2-4]. In addition, serum originates from a non-physiological clotting process [37] and its use in embryo culture has been associated with phenotypic disorders such as increased birth weight [38]. Polyvinylalcohol and PVP-40 are synthetic polymers used in the cell culture medium for the stabilization of osmotic pressure and as protective agents and chelants of heavy metal ions. Although few reports are available about their physicochemical properties, these polymers are known to be able to affect the properties of cell adhesion, protein adsorption and diffusion of paracrine and autocrine factors in the culture medium [8, 39]. Polyvinylpyrrolidone seems to differ from PVA in some properties such as molecular weight, solubility and pH. Indeed, Wang et al [40] stated that different polymers may have different properties including molecular weight, charge type and density, structure and sequence, and conformational flexibility of the molecule, which are associated with differences in cytotoxicity. Ali and Sirard [9] reported that replacing PVP-40 with PVA in IVM medium reduced embryonic development, especially at the morula and blastocyst stages. Pinyopummintr and Bavister [41] also demonstrated that post-cleavage embryonic development was reduced when BSA or serum were replaced with PVA. However, in the present study we did not observe distinct effects of IVM medium supplementation with PVA or PVP-40 on blastocyst or hatching rates. In agreement with the present study, Chung et al. [15] also reported that PVP used for maturation has no deleterious effect on subsequent embryonic development compared to FCS. A inverse observation was made by Warzych et al. (2007) [42], that report significantly lower rate of blastocysts resulting from oocytes matured in TCM supplemented with PVP-40. However, a higher concentration of PVP-40 (4%) was used in maturation medium, what may have a negative effect on developmental competence of oocytes and additionally the maturation medium was supplemented with FSH and LH, without growth factors.

Growth factors may be necessary for successful IVM in the presence of PVA or PVP. Oyamada et al. [43] observed that EGF in maturation medium supplemented with PVA stimulated embryonic development compared to the control group. In the present study, IGF-1 and insulin were added to the maturation media with PVA and PVP, what may have contributed to the success of maturation and embryonic development even in the absence of gonadotrophins. We observed that IGF-I and

insulin at physiological doses stimulated oocyte maturation in the absence of gonadotrophins. The biological effects of these peptides start with the activation of tyrosine kinase receptors, resulting in the activation of the two major signaling molecules of the insulin receptor (IR), i.e., the substrate of the insulin receptor and IGF-I (IRS-1 or IRS-2) and the enzyme phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) linked to the MAP kinase pathway (MAPK mitogen-activated protein kinase), also called extracellular regulated kinase (ERK) [44, 45], one of the regulators of the cell cycle and of oocyte maturation. Several studies have reported that IGF-I and insulin positively affect the IVM of bovine [25, 26], porcine [27], ovine [23], murine [24] and human [22] oocytes. Because of its importance for follicular development, FSH is frequently employed in IVM media to increase the effectiveness of the maturation process. The use of gonadotrophins in *in vitro* maturation has been reported to be important for embryonic development [46-48] and has been indicated for maturation media [49], although its use is still controversial [9, 17]. Previous studies did not show a beneficial effect of FSH or LH on IVM and subsequent embryonic development [50, 51]. On the other hand, the effects of FSH and LH on oocyte maturation can be modulated by the presence of serum. Kito and Bavister [52] observed that the effect of FSH and LH on the rate of meiotically matured hamster oocytes was greater in the presence of FCS than in its absence. Thus, gonadotrophins may not be essential for maturation in the absence of serum, as observed in the present experiment.

No differences in the relative abundance of Hsp-70 and Bax gene transcripts was observed in the blastocyst groups produced in the three IVM systems assessed in the present study. Since the expression of genes related to the cell response to stress such as heat shock proteins (Hsp) and Bax may be altered during oocyte and embryo culture [42, 53], the expression of these genes may be a marker of culture conditions. The Hsp-70 gene is a modulator of the cellular response to thermal stress. Heat shock proteins play a protective role inside the cell and have an anti-apoptotic function [54]. Bax is a pro-apoptotic gene and its role is associated with Bcl-2 activity. The proportion of Bax:Bcl-2 proteins predetermined the cellular response to an apoptotic stimulus [55]. It has been suggested that interaction in the expression of the Hsp-70

and Bax genes may occur under stress conditions, with suppression of Bax activation in cells with high Hsp-70 levels [56].

Although no difference was observed in the level of Hsp-70 gene transcripts between the experimental groups, some authors have reported up-regulated expression of this gene in embryos derived from oocytes matured in TCM-199 medium supplemented with 10% serum compared to defined or semi-defined maturation media or media containing a smaller percentage of serum [5, 6, 42]. Sagirkaya et al [2] reported that RA for Hsp-70 gene was altered under different IVM of bovine oocytes in medium supplemented with FCS or SSS. Warzych et al [42] suggested that serum present in the culture medium acts as a stressor inducing the expression of the Hsp-70 gene. However, conflicting results have been reported [57, 58] and different serum sources (FCS, OCS, etc.) or the interference of different lots with the results obtained have not been determined. The supplements added to the IVM medium in the present study also did not affect the level of Bax gene transcripts in the blastocysts produced. However, we observed a tendency of down-regulation of the Bax gene in embryos resulting from oocytes matured in alpha-MEM medium supplemented with PVA, although no significant difference was observed in this experiment. Warzych et al [42] also did not observe changes in the relative abundance of Bax gene transcripts in oocytes or Day 9 blastocysts after IVM with PVP-40, BSA or SFB. Up-regulation of the Bax gene in embryos produced *in vitro* has been reported in several studies [59, 60]. However, the increase in the RA of this gene was still observed in blastocysts after in vitro culture (IVC) with serum [59] and not in resulting preimplantational bovine blastocysts from oocytes matured with FBS. Data about the influence of IVM media composition on the expression of the Bax gene in bovine embryos is scarce. Warzych et al [42] were the first to publish data about the expression of this gene in embryos resulting from oocytes matured under different culture conditions.

In conclusion, the results of the present study indicate that bovine oocytes can be matured in serum- and gonadotrophin-free medium supplemented with PVA or PVP-40 and growth factors with no changes in post-cleavage development or in the RA of stress-associated genes such as Hsp-70 and Bax. However, a better understanding of the basic factors that control the biofunctionality of these synthetic polymers in culture systems is needed, and the risk of immunogenic and cytotoxic risks for

oocyte and embryo should be investigated.

### **Acknowledgments**

Research supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP. The authors wish to thank the CNPq/FAP-DF, FUNPE, FINATEC and FAEPA/HCFMRP/USP, and Vitrogen Animal Reproduction for laboratory assistance, the Barra Mansa Meat Plant, Sertãozinho, SP, for supplying the bovine ovaries, the Animal Reproduction Laboratory – Dairy Cattle-CNPGL for supplying estrus cow serum, and Agrográfica for permitting the use of their real time-PCR apparatus.

### **References**

1. Gardner DK. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biol Int.* 1994 Dec;18(12):1163-79.
2. Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First NL, Parrish JJ, Memili E. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Anim Reprod Sci.* 2007 Oct;101(3-4):225-40.
3. Wang HF, Isobe N, Kumamoto K, Yamashiro H, Yamashita Y, Terada T. Studies of the role of steroid hormone in the regulation of oocyte maturation in cattle. *Reprod Biol Endocrinol.* 2006;4:4.
4. Wang WH, Abeydeera LR, Cantley TC, Day BN. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by in vitro fertilization. *J Reprod Fertil.* 1997 Sep;111(1):101-8.
5. Russell DF, Baqir S, Bordignon J, Betts DH. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Mol Reprod Dev.* 2006 Oct;73(10):1255-70.
6. Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol Reprod Dev.* 1999 May;53(1):8-18.

7. Watson AJ, De Sousa P, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J, et al. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biol Reprod.* 2000 Feb;62(2):355-64.
8. Hirao Y, Itoh T, Shimizu M, Iga K, Aoyagi K, Kobayashi M, et al. In vitro growth and development of bovine oocyte-granulosa cell complexes on the flat substratum: effects of high polyvinylpyrrolidone concentration in culture medium. *Biol Reprod.* 2004 Jan;70(1):83-91.
9. Ali A, Sirard MA. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol Reprod.* 2002 Apr;66(4):901-5.
10. Downs SM, Dow MP, Fagbohun CF. The meiotic response of cumulus cell-enclosed mouse oocytes to follicle-stimulating hormone in the presence of different macromolecules. *J Exp Zool.* 1991 Jun;258(3):373-83.
11. Keskinetepe L, Brackett BG. In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol Reprod.* 1996 Aug;55(2):333-9.
12. Lonergan P, Fair, T, Gordon, I, editor. Effect of time of transfer to granulosa cell monolayer and cell-stage at 48 hours post-insemination on bovine oocyte development following IVM/IVF/IVC. *Proceedings of the Eighth Conference of European Embryo Transfer Association; 1992; Lyon.*
13. Mizushima S, Fukui Y. Fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined maturation medium. *Theriogenology.* 2001 Apr 15;55(7):1431-45.
14. Monaghan P CC, Lonergan P, Sharif H, Wahid H, Gordon I. The effect of maturation time on the subsequent in vitro development of bovine oocytes. *Theriogenology.* 1993;39:370.
15. Chung JT, Tosca L, Huang TH, Xu L, Niwa K, Chian RC. Effect of polyvinylpyrrolidone on bovine oocyte maturation in vitro and subsequent fertilization and embryonic development. *Reprod Biomed Online.* 2007 Aug;15(2):198-207.
16. Sirard MA, Coenen K. The co-culture of cumulus-enclosed bovine oocytes and hemi-sections of follicles: Effects on meiotic resumption. *Theriogenology.* 1993

Nov;40(5):933-42.

17. Ali A PF, Vigneault C, Sirard MA. The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev* 2005;71(3):358-67.
18. Anderiesz C, Ferraretti A, Magli C, Fiorentino A, Fortini D, Gianaroli L, et al. Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development in vitro. *Hum Reprod.* 2000 May;15(5):1140-8.
19. Beker-van Woudenberg AR, Zeinstra EC, Roelen BA, Colenbrander B, Bevers MM. Developmental competence of bovine oocytes after specific inhibition of MPF kinase activity: effect of estradiol supplementation and follicle size. *Anim Reprod Sci.* 2006 May;92(3-4):231-40.
20. Dode MA, Graves C. Involvement of steroid hormones on in vitro maturation of pig oocytes. *Theriogenology.* 2002 Jan 15;57(2):811-21.
21. Choi YH, Carnevale EM, Seidel GE, Jr., Squire EL. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology.* 2001 Sep 1;56(4):661-70.
22. Goud PT, Goud AP, Qian C, Laverge H, Van der Elst J, De Sutter P, et al. In-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. *Hum Reprod.* 1998 Jun;13(6):1638-44.
23. Guler A, Poulin N, Mermillod P, Terqui M, Cognie Y. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. *Theriogenology.* 2000 Jul 15;54(2):209-18.
24. Kiapekou E, Loutradis D, Drakakis P, Zapanti E, Mastorakos G, Antsaklis A. Effects of GH and IGF-I on the in vitro maturation of mouse oocytes. *Hormones (Athens).* 2005 Jul-Sep;4(3):155-60.
25. Makarevich AV, Markkula M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biol Reprod.* 2002 Feb;66(2):386-92.
26. Shimizu T, Murayama C, Sudo N, Kawashima C, Tetsuka M, Miyamoto A. Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. *Anim Reprod Sci.* 2007 Apr 18.

27. Singh B, Armstrong DT. Insulin-like growth factor-1, a component of serum that enables porcine cumulus cells to expand in response to follicle-stimulating hormone in vitro. *Biol Reprod.* 1997 Jun;56(6):1370-5.
28. Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. London: Cambridge University Press; 1994.
29. Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod.* 1988 Jun;38(5):1171-80.
30. Rosenkrans CF, Jr., First NL. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. *J Anim Sci.* 1994 Feb;72(2):434-7.
31. Rozen S, Skaletsky, HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist. programmers. In: Krawetz S, Misener S. In: Krawetz S MS, editor. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Totowa, NJ: Humana Press; 2000. p. 365-86.
32. Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Nov 20;98(24):13734-8.
33. Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev.* 1990 May;26(1):90-100.
34. Buccione R, Vanderhyden BC, Caron PJ, Eppig JJ. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Dev Biol.* 1990 Mar;138(1):16-25.
35. Chen L, Russell PT, Larsen WJ. Sequential effects of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on mouse cumulus expansion in vitro. *Biol Reprod.* 1994 Aug;51(2):290-5.
36. Nagyova E, Prochazka R, Vanderhyden BC. Oocytectomy does not influence synthesis of hyaluronic acid by pig cumulus cells: retention of hyaluronic acid after insulin-like growth factor-I treatment in serum-free medium. *Biol Reprod.* 1999 Sep;61(3):569-74.
37. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum*



Reprod Update. 1995 Mar;1(2):91-148.

38. Jacobsen H, Schmidt M, Holm P, Sangild PT, Vajta G, Greve T, et al. Body dimensions and birth and organ weights of calves derived from in vitro produced embryos cultured with or without serum and oviduct epithelium cells. *Theriogenology*. 2000 Jun;53(9):1761-9.

39. Matsudo T, Ogawa K, Kokufuta E. Complex formation of protein with different water-soluble synthetic polymers. *Biomacromolecules*. 2003 Nov-Dec;4(6):1794-9.

40. Wang YX, Robertson JL, Spillman WB, Jr., Claus RO. Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility. *Pharm Res*. 2004 Aug;21(8):1362-73.

41. Pinyopummintr T, Bavister BD. In vitro-matured/in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biol Reprod*. 1991 Nov;45(5):736-42.

42. Warzych E, Wrenzycki C, Peippo J, Lechniak D. Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced in vitro. *Mol Reprod Dev*. 2007 Mar;74(3):280-9.

43. 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*. 2004 May;12(2):143-50.

44. Denley A, Carroll JM, Brierley GV, Cosgrove L, Wallace J, Forbes B, et al. Differential activation of insulin receptor substrates 1 and 2 by insulin-like growth factor-activated insulin receptors. *Mol Cell Biol*. 2007 May;27(10):3569-77.

45. Grigorescu F, Baccara MT, Rouard M, Renard E. Insulin and IGF-1 signaling in oocyte maturation. *Horm Res*. 1994;42(1-2):55-61.

46. Gliedt DW, Rosenkrans CF, Jr., Rorie RW, Munyon AL, Pierson JN, Miller GF, et al. Effects of media, serum, oviductal cells, and hormones during maturation on bovine embryo development in vitro. *J Dairy Sci*. 1996 Apr;79(4):536-42.

47. Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge ML, First NL. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol Reprod*. 1991 Feb;44(2):256-60.

48. Younis AI, Brackett BG, Fayrer-Hosken RA. Influence of serum and

hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Res.* 1989 Jun;23(2):189-201.

49. Lane M GD. Preparation of gametes, in vitro maturation, in vitro fertilization and embryo recovery and transfer. In: Gardner D, Lane, M. and Watson, AJ, editor. *A laboratory guide to the mammalian embryo.* London: Oxford University Press; 2004. p. 394.

50. Olson SE TW, Seidel GE. Effects of gonadotropins during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryonic development. *Theriogenology.* 1991;35:250.

51. Trounson A PD, Maclellan LJ, Lewis I, Gardner DK. Current status of IVM/IVF and embryo culture in humans and farm animals. *Theriogenology.* 1994;42:57-6.

52. Kito S, Bavister BD. Gonadotropins, serum, and amino acids alter nuclear maturation, cumulus expansion, and oocyte morphology in hamster cumulus-oocyte complexes in vitro. *Biol Reprod.* 1997 May;56(5):1281-9.

53. Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E, Niemann H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reprod Fertil Dev.* 2005;17(1-2):23-35.

54. Edwards JL, King WA, Kawarsky SJ, Ealy AD. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione. *Theriogenology.* 2001 Jan 1;55(1):209-23.

55. Basu A, Haldar S. The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod.* 1998 Dec;4(12):1099-109.

56. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem.* 2005 Nov 18;280(46):38729-39.

57. Knijn HM, Wrenzycki C, Hendriksen PJ, Vos PL, Herrmann D, van der Weijden GC, et al. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo. *Reproduction.* 2002 Sep;124(3):365-75.

58. Wrenzycki C, Herrmann D, Keskinetepe L, Martins A, Jr., Sirisathien S, Brackett B, et al. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod.* 2001 May;16(5):893-901.
59. Rizos D, Lonergan P, Boland MP, Arroyo-Garcia R, Pintado B, de la Fuente J, et al. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol Reprod.* 2002 Mar;66(3):589-95.
60. Lonergan P. Predicting embryo quality: mRNA expression and the preimplantation embryo. *Reproductive Biomedicine Online* 2005;11(3):340-8.

MANUSCRITO 2

DEVELOPMENTAL CAPACITY AND STEROIDOGENESIS OF BOVINE CUMULUS-OOCYTE COMPLEXES CULTURED IN  $\alpha$ -MEM MEDIUM SUPPLEMENTED WITH PVA OR PVP-40

A ser enviado para publicação: **Animal Reproduction Science**

**Developmental capacity and steroidogenesis of bovine cumulus-oocyte complexes matured in  $\alpha$ -MEM medium supplemented with PVA or PVP-40**

A.A. Vireque<sup>1</sup>; L.S.A. Camargo<sup>2</sup>; E.M. Ferreira<sup>1</sup>; A.A.M. Rosa e Silva<sup>3</sup>; Y.F. Watanabe<sup>4</sup>;  
W.P. Martins<sup>1</sup>; P.A.A.S. Navarro<sup>1</sup>; R.A. Ferriani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology of School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo 14049-900, Ribeirão Preto-SP, Brazil.

<sup>2</sup>Embrapa Dairy Cattle, Juiz de Fora- MG, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Physiologic Sciences – University of Brasília 70910-900, Brasília-DF, Brazil.

<sup>4</sup>Vitrogen Animal Reproduction, Cravinhos, SP, Brazil

Running title: Steroidogenesis of COCs in chemically defined IVM system.

<sup>1</sup>Corresponding author: +55 16 3421 8002; Fax: +55 16 3602 2231

e-mail address: [alessandra\\_vireque@yahoo.com.br](mailto:alessandra_vireque@yahoo.com.br)

## Abstract

The influence of the culture medium and its supplements on *in vitro* maturation and steroids secretion by bovine cumulus-oocyte complexes (COCs) were examined. Immature COCs were matured for 24h in  $\alpha$ -MEM supplemented with IGF-1, insulin and 0.1% PVA or 0.1% PVP-40. Neither FSH nor LH was used in both treatments. The control group consisted of COCs matured in TCM plus FSH and 10% oestrous cow serum. After fertilization, presumptive zygotes were co-cultured with cumulus cells until 224 h post insemination (hpi). Steroids production was measured in culture medium after IVM and cumulus cells (CC) estrogenic activity was estimated by estradiol production and by evaluating the ratio of estradiol (E2) to progesterone (P4). Cleavage, blastocyst and hatching rates were evaluated 168-224 hpi. Elevated estrogenic activity (E2:P4 ratio > 1.0) was detected in culture medium of chemically defined IVM systems. Estradiol concentrations were 22.86 ng/ml and 22.46 ng/ml for PVA and PVP-40, respectively, and 0.27 ng/ml ( $p < 0,001$ ) for control group. Progesterone secretion was lower in MEM- $\alpha$  + PVP-40 medium. There was no difference ( $P > 0.05$ ) in blastocyst (48.92%; 49.56% and 44.21%) and hatching (38.46%; 41.96% and 40.78%) rates among PVA, PVP and control groups, respectively. These results indicated that the effect of IGF-I/insulin and PVA or PVP-40 in IVM medium was similar to oestrus calf serum (OCS) and FSH in terms of oocyte maturation and subsequent embryonic development and that CC of COCs cultured in medium supplemented with serum during IVM have decreased aromatase activity.

**Keywords:** cumulus-oocyte complexe; IVM defined medium; PVA; PVP-40; steroidogenesis; embryonic development.

**Capacidade para o desenvolvimento e esteroidogênese de complexos cumulus-  
oócito bovinos maturados em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com PVA ou PVP-40**

A.A. Vireque<sup>1</sup>; L.S.A. Camargo<sup>2</sup>; E.M. Ferreira<sup>1</sup>; A.A.M. Rosa e Silva<sup>3</sup>; Y.F. Watanabe<sup>4</sup>;  
W.P. Martins<sup>1</sup>; P.A.A.S. Navarro<sup>1</sup>; R.A. Ferriani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,  
Universidade de São Paulo 14049-900, Ribeirão Preto-SP, Brasil.

<sup>2</sup>Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora- MG, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas – Universidade de Brasília 70910-900, Brasília-DF,  
Brasil.

<sup>4</sup>Vitrogen, Cravinhos, SP, Brazil

Título conciso: Esteroidogênese de CCOs em sistema de MIV quimicamente  
definido.

<sup>1</sup>Autor correspondente: +55 16 3421 8002; Fax: +55 16 3602 2231

e-mail: [alessandra\\_vireque@yahoo.com.br](mailto:alessandra_vireque@yahoo.com.br)

## Resumo

Foi avaliada a influência do meio de cultura e seus suplementos na maturação *in vitro* e secreção de esteróides por complexos cumulus-oócito bovinos (CCO). CCOs imaturos foram maturados durante 24 h em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com IGF-1, insulina e 0,1% PVA ou 0,1% PVP-40. Não foram usados FSH ou LH nestes dois tratamentos. O grupo controle consistiu de CCOs maturados em TCM suplementado com FSH e 10% de soro de vaca em estro (SVE). Após a fertilização, os prováveis zigotos foram co-cultivados com células do cumulus até 224 h pós-inseminação (hpi). A produção de esteróides foi determinada nos meios de cultura após a MIV e a atividade estrogênica das células do cumulus (CC) foi estimada pela produção de estradiol e pela avaliação da relação estradiol (E2):progesterona (P4). As taxas de clivagem, blastocisto e eclosão foram avaliadas 168-224 hpi. Foi observada elevada atividade estrogênica das CC nos sistemas de MIV quimicamente definidos. As concentrações de estradiol foram 22,86 ng/ml e 22,46 ng/ml nos grupos PVA e PVP-40, respectivamente, e 0,27 ng/ml no grupo controle ( $p < 0,001$ ). A secreção de progesterona foi menor no meio MEM- $\alpha$  + PVP-40. Não houve diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) nas taxas de blastocisto (48,92%; 49,56% e 44,21%) e eclosão (38,46%; 41,96% e 40,78%) entre os grupos PVA, PVP e o controle, respectivamente. Estes resultados indicam que os efeitos do IGF-I/insulina e PVA ou PVP-40 no meio de MIV foram similares ao SVE e FSH em termos de maturação oocitária e desenvolvimento embrionário subsequente e que as CC de CCOs cultivados em meio suplementado com soro durante a MIV têm reduzida atividade de aromatase.

*Palavras-chave:* complexo cumulus-oócito; meio de MIV definido; PVA; PVP-40; esteroidogênese; desenvolvimento embrionário.



## 1-Introdução

A maturação do oócito é um processo complexo que envolve a progressão do ciclo meiótico e a reprogramação dos eventos citoplasmáticos [1]. *In vivo*, a ocorrência da maturação é caracterizada pelo alto potencial de desenvolvimento da célula pós-fertilização, contudo, em condições experimentais (*maturação in vitro* ou por meio de técnicas de superovulação) a qualidade do oócito cai drasticamente. Esta etapa limitante na tecnologia da produção *in vitro* de embriões levou à formulação de diferentes sistemas de MIV com meios de cultura acrescidos de células ou tecidos e/ou suplementados com fluidos biológicos na tentativa de mimetizar os eventos que ocorrem no microambiente folicular [2-8].

A substituição do soro e albumina por macromoléculas sintéticas nos meios de cultura têm sido uma tentativa de tornar os sistemas de MIV mais fisiológicos, minimizando ou eliminando fatores que possam interferir na sinalização entre o oócito e as células foliculares e alterar os padrões de secreção de hormônios e fatores parácrinos/autócrinos característicos do período peri-ovulatório. A presença de soro nos meios de cultura está associada a variações entre lotes, aumento do risco de contaminação por vírus e prions e problemas durante o desenvolvimento fetal [9]. Há evidências que a polivinilpirrolidona (PVP) e o álcool polivinílico (PVA) podem substituir proteínas [10] e o soro na maturação *in vitro* de oócitos bovinos sem comprometer o desenvolvimento subsequente [11-16]. O PVA e o PVP-40 são polímeros sintéticos de alto peso molecular, capazes de afetar as propriedades de adesão das células, adsorção de proteínas e a difusão de fatores parácrinos e autócrinos no meio de cultura [17, 18]. A adição de gonadotrofinas, fatores de crescimento e esteróides aos meios de MIV também tem sido extensivamente investigada e reavaliada [19-22], contudo ainda não há uma conclusão definitiva a cerca da melhor e mais adequada suplementação hormonal. Diversos estudos reportam que o IGF-I e a insulina afetam positivamente a maturação *in vitro* de oócitos bovinos [23, 24], suínos [25], ovinos [26], murinos [27] e humanos [28], além de estimular a produção de estradiol em CG murais e CC [29-33].

A atividade esteroidogênica das células do cumulus (CC) tem sido descrita como um marcador da viabilidade do complexo cumulus-oócito e do potencial de fertilização e

desenvolvimento pós-clivagem do oócito [8, 34, 35]. A atividade de aromatase *in vitro* das células do cumulus de CCOs pode ser uma ferramenta útil na investigação da fisiologia do complexo cumulus-oócito, do papel dos esteróides na maturação do oócito e na avaliação das condições de cultura durante a MIV. A relação E2:P4 tem sido utilizada para avaliar a viabilidade folicular [36] e Crowe et al. (2001) [37] sugerem que altas concentrações de E2 e alta relação E2:P4, características do folículo dominante, estão correlacionadas com a atividade de aromatase e o potencial estrogênico das CG.

O objetivo deste estudo foi determinar o potencial do oócito para o desenvolvimento pré-implantação e a biossíntese de esteróides (estradiol e progesterona) pelas CC de CCOs bovinos maturados em meio Alfa-MEM, quimicamente definido, sem gonadotrofinas, suplementado com macromoléculas sintéticas e fatores de crescimento, e avaliar se a suplementação com PVA ou o PVP-40 influenciam distintamente os parâmetros avaliados.

## **2- Materiais e Métodos**

### *2.1. Reagentes e Meios de cultura para a produção in vitro de embriões*

Para o preparo dos meios de cultura Talp Hepes, SPTL, Fert-Talp e CR2 foram utilizados reagentes (sais) Sigma Chemical CO (St. Louis, MO). Os suplementos usados nos meios de cultura foram: Albumina Sérica Bovina fração V (Sigma), Albumina Bovina livre de ácidos graxos (Sigma), Heparina (Sigma), Soro Fetal Bovino (Invitrogen), Glicina, Glutamina, Alanina (Sigma) e Penicilina-Estreptomicina (Invitrogen).

### *2.2. Meios de cultura para a maturação in vitro*

Complexos cumulus-oócito foram cultivados em meio  $\alpha$ -MEM (Minimum Essential Medium- Invitrogen), suplementado com 0,1% de PVA (Sigma) ou PVP-40 (Sigma); 100 ng/ml de insulina bovina (Sigma); 10 ng/ml de IGF-1 recombinante humano (Invitrogen);  $10^{-7}$ M de androstenediona (Sigma); 11 mM de aminoácidos não-

essenciais (Gibco); 5µg/ml de transferrina humana (Sigma); 1,4 ng/ml de selênio de sódio (Acros Organics); 10 mM de bicarbonato de sódio (Gibco); 0,02M de hepes e antibióticos (10000 UI de penicilina e 10000 UI de estreptomicina) (Sigma). O grupo controle consistiu de meio TCM-199 (Invitrogen-Gibco BRL), suplementado com 10% de soro de vaca em estro (SVE) inativado a 56° C durante 30 minutos e 20 µg/ml de FSH (Folltropin- Vetrepharm Canadá, London, ON, Canadá) (meio controle).

### *2.3.1. Coleta e maturação in vitro de oócitos bovinos*

Os ovários foram coletados em abatedouro e transportados ao laboratório em solução fisiológica a 0,9% suplementada com 0,05 g/L de estreptomicina a 33-37° C. Os folículos de 3-8 mm de diâmetro foram aspirados com auxílio de agulhas 21 G, adaptadas em seringas de 20 mililitros. CCOs recuperados do aspirado folicular foram lavados em meio TALP-Hepes contendo NaCl, KCl, NaHCO<sub>3</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na-lactato, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 1 M de Hepes, Pen-Strep, 100 mM de Na-pyruvato and PVA ou BSA (pH 7.4) e foram morfologicamente avaliados em microscópio estereoscópio. Somente oócitos com citoplasma homogêneo e com mais de três camadas de células da granulosa foram selecionados para o estudo. O pool de CCOs imaturos selecionados para a MIV foi dividido em três grupos experimentais: 1) meio α-MEM suplementado com IGF-1, insulina e 0.1% PVA 2) meio α-MEM suplementado com IGF-1, insulina e 0.1% PVP ou 3) TCM-199 suplementado com FSH e 10% de soro de vaca em estro (controle) e cultivados durante 22-24 horas em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> e 38,5° C, em placa NUNC de 4 poços na densidade de 1 CCO/µl de meio.

### *2.4. Dosagens Hormonais*

Os meios de cultura retirados antes (tempo 0h) e no final da MIV foram estocados em freezer a -20°C para as dosagens de progesterona e 17β-estradiol segundo método de quimioluminescência – Immulite. Foram cultivados 40 CCOs/400µl de meio de cultura. Os coeficientes de variação intra-ensaio foram inferiores a 10% e, para cada

esteróide, todas as amostras foram analisadas no mesmo ensaio para evitar variabilidade inter-ensaio.

### *2.5. Produção in vitro dos embriões*

Oócitos maduros foram inseminados com espermatozóides descongelados obtidos pelo método de swim-up [38]. O meio usado para o swim-up foi o Sperm Talp [39] suplementado com 6m/ml de BSA fração V. A fertilização foi realizada em gotas de 100 µl de meio Fert Talp [39] suplementado com 20 µg/ml de heparina e 6mg/ml de BSA livre de ácidos graxos, sob óleo mineral. Aproximadamente  $2 \times 10^6$  espermatozóides/ml foram co-incubados com CCOs durante 18h em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub> e 38,5 ° C. Após a fertilização, os oócitos foram parcialmente desnudados por pipetagem em meio Talp [39] e os prováveis zigotos com até 2-3 camadas de células do cumulus foram cultivados em gotas de 50 µl de meio CR2aa [40] suplementado com 10% de soro fetal (Invitrogen) e 1mg/ml de BSA sob óleo mineral, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> e 38,5° C. O meio de cultura foi renovado a cada 48 horas. A taxa de clivagem foi avaliada 72 horas pós-inseminação (hpi), as taxas de mórulas e blastocistos 168-192 hpi e as taxas de eclosão 224 hpi. As taxas de clivagem e blastocistos foram calculadas com base no número de zigotos e as taxas de eclosão a partir do número de blastocistos.

### *2.6. Análise estatística*

A análise das dosagens hormonais foi realizada utilizando-se o programa GraphPad 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Inicialmente foi calculado o valor da média e desvio padrão para todas as variáveis, seguido do teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov). Como os valores para o estradiol não passaram pelo teste de normalidade, os tratamentos foram comparados através do teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn e apresentados na forma de média e desvio interquartil (DIQ). Os valores de progesterona foram analisados por ANOVA e as médias ± DP comparadas pelo teste de Tukey. As taxas de clivagem e blastocisto foram analisadas pelo Qui-Quadrado e as taxas de eclosão foram

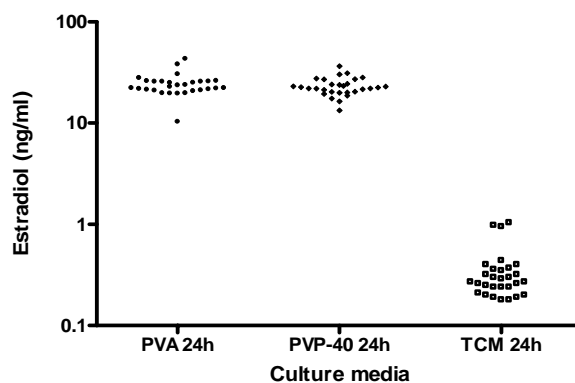
analisadas pelo Teste de Fisher. O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

### 3- Resultados

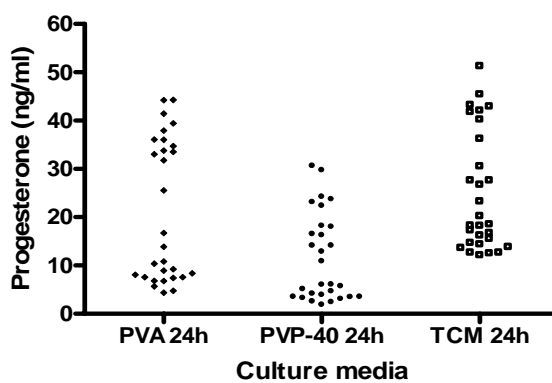
#### 3.1. Produção de estradiol e progesterona por COCs bovinos maturados em meio quimicamente definido.

Estradiol (E2) e progesterona (P4) foram dosados nos meios de cultura das amostras retiradas no tempo zero, sem os CCOS, e após 24 horas de maturação *in vitro*, com o objetivo de investigar a atividade funcional das células do cumulus oophorus por meio da secreção destes esteróides e da relação E2:P4. A concentração de estradiol nos meios de cultura no tempo 0h foi significativamente maior ( $p < 0,001$ ) no meio  $\alpha$ -MEM suplementado com PVA (mediana=647pg/ml, DIQ=40,5pg/ml) em relação ao meio suplementado com PVP-40 (mediana=95,5pg/ml, DIQ=10,35pg/ml), mas não em relação ao meio TCM (mediana=127,5pg/ml, DIQ=47,5pg/ml). Também não foi observada diferença significativa entre estes dois últimos. As concentrações de P4 no tempo 0h foram indetectáveis em todos os grupos experimentais.

Após 24h de cultura, CCOs maturados nos sistemas de MIV definidos secretaram quantidades substanciais de estradiol, aproximadamente, 100 vezes mais (22,78 ng/ml e 22,46 ng/ml para os grupos PVA e PVP-40, respectivamente) que COCs maturados em TCM-199 suplementado com soro (0,27 ng/ml) ( $P < 0,001$ ). A produção de estradiol foi similar entre CCOs maturados em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com PVA ou PVP-40 (gráfico 1). A relação E2:P4 ao fim da MIV foi significativamente maior nestes grupos experimentais (1.8 e 3.7, respectivamente) se comparado ao controle. Em contraste, CCOs maturados em TCM-199 mostraram uma relação inversa entre a produção de estradiol e progesterona (0.012). A secreção de progesterona após 24 horas de MIV foi menor no grupo PVP (11.5±9.0 ng/ml) ( $P < 0,001$ ), sem diferença estatística significativa ( $P > 0,05$ ) entre o grupo PVA (22.00±14.6 ng/ml) e o controle (25.04±12.4 ng/ml) (gráfico 2).



**Gráfico 1-** Concentração de estradiol (pg/ml) em diferentes meios de cultura após 24h de maturação *in vitro* de complexos cumulus-oócito bovinos. TCM-199 e  $\alpha$ -MEM, suplementado com PVA ou PVP-40.



**Gráfico 2-** Concentração de progesterona (ng/ml) em diferentes meios de cultura após 24 horas de maturação *in vitro* de complexos cumulus-oócito bovinos. TCM-199 e  $\alpha$ -MEM, suplementado com PVA ou PVP-40.

### 3.2- Produção *in vitro* de embriões

A taxa de clivagem total foi maior no grupo controle (72,53%) se comparada aos grupos PVA (60,22%) e PVP-40 (68,14%) ( $P < 0,05$ ). No entanto, não houve diferença estatística significativa nos índices de blastocistos produzidos (48,92%; 49,56% e 44,21%) e nas taxas de eclosão em relação ao número total de blastocistos (38,46%; 41,96% e 40,78%) entre CCOs maturados em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com PVA ou PVP-40, sem gonadotrofinas, e em meio TCM suplementado com FSH e soro (tabela 1).

Tabela 1. Desenvolvimento embrionário de oócitos maturados *in vitro* em meio  $\alpha$ MEM suplementado com fatores de crescimento e PVA ou PVP-40

| Grupo Experimental | Total zigotos | Clivagem % (n)           | Blastocisto % (n)        | Eclosão % (n)           |
|--------------------|---------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
|                    |               | 72 hpi                   | 168-192 hpi              |                         |
| PVA                | 186           | 60,22 (112) <sup>a</sup> | 48,92 (91) <sup>a</sup>  | 38,46 (35) <sup>a</sup> |
| PVP                | 226           | 68,14 (154) <sup>a</sup> | 49,56 (112) <sup>a</sup> | 41,96 (47) <sup>a</sup> |
| TCM                | 233           | 72,53 (169) <sup>b</sup> | 44,21 (103) <sup>a</sup> | 40,78 (42) <sup>a</sup> |

HPI: horas pós-inseminação. Diferentes sobrescritos indicam diferença estatística (Qui-Quadrado; Teste de Fisher;  $P < 0,05$ ).

## 4- Discussão

Os resultados do presente estudo demonstram que CCOs bovinos cultivados em meio  $\alpha$ -MEM contendo IGF-I e insulina, suplementado com macromoléculas sintéticas, sem a adição de gonadotrofinas e soro, secretam quantidades substanciais de progesterona e estradiol durante a MIV. Neste sistema de MIV, as CC são responsivas a doses fisiológicas de IGF-I e insulina e apresentam elevada atividade estrogênica ( $E2:P4 > 1$ ), correlacionada com elevada atividade da P450arom.

Spicer et al (2002) [33] reportam que a insulina e o IGF-I regulam a atividade de aromatase em CG bovinas cultivadas por meio de ação sinérgica com o FSH e que,

na ausência de FSH, o efeito da insulina e IGF-I sobre a P450arom foi dose dependente. Uma hipótese tem sido que estes peptídeos atuam como amplificadores das ações gonadotróficas no ovário [33, 41]. Outros estudos também observaram aumento na atividade esteroidogênica em CG em cultivos livres de soro e na presença de IGF-I e insulina [32, 42]. Nossos resultados demonstram que o IGF-I e/ou insulina podem potencialmente estimular a P450arom em CC, na ausência de gonadotrofinas, o que está de acordo com dados obtidos por Gutierrez et al (1997) [32] em cultura de CG murais. A androstenediona utilizada nos cultivos livres de soro e gonadotrofinas também pode ter influenciado a maior secreção de estradiol nesses cultivos, uma vez que é o substrato essencial para a aromatização [43, 44]. As diferenças na produção de E2 entre os meios livres de soro e o meio TCM199 com 10% de SVE podem ser explicadas por uma redução da capacidade esteroidogênica provocada pelo soro, pois CG cultivadas *in vitro* podem apresentar luteinização [44, 45], com redução na secreção de estradiol e aumento da progesterona na presença de FSH [45]. Gutiérrez et al (1997) [32] também observaram que doses farmacológicas de FSH em culturas de CG estão associadas a declínio na secreção de estradiol.

A esteroidogênese *in vitro* das células do cumulus tem sido descrita como um marcador da viabilidade do CCO e do potencial de fertilização e desenvolvimento pós-clivagem do oócito [8, 34, 35]. Embora, no sistema de MIV quimicamente definido, suplementado com PVA ou PVP-40, os oócitos tenham sido maturados em um meio com alta proporção E2:P4 não foi possível estabelecer neste estudo uma correlação entre o perfil esteroidogênico dos CCOs durante a MIV e o potencial do oócito para o desenvolvimento embrionário pré-implantação. Como não foi avaliado o *time course* da secreção dos esteróides não foi possível estabelecer uma correlação entre o grau de maturidade do oócito e a secreção de E2. No entanto, tem sido observado em experimentos em nosso laboratório que a secreção de E2 por CCOs bovinos maturados em meio definido atinge um platô com 14-16 horas e decresce até 24 horas de MIV (resultados não publicados). Lucidi et al (2003) [35] observaram que a esteroidogênese de CC cultivadas em monocamada é influenciada pelo grau de maturação do oócito. Embora o papel dos esteróides na maturação oocitária ainda não esteja estabelecido, a secreção de esteróides durante a MIV e a alta proporção E2:P4 observada podem ser indicativos de condições de cultura mais fisiológicas, já



que a atividade de aromatase é um marcador do status folicular *in vivo* [36, 46, 47]. Em adição, Carson et al. (1982) [48] reportam desenvolvimento embrionário superior e maior índice de gestações na FIV humana usando oócitos aspirados de folículos que contêm altas concentrações de E2 e maior relação E2:P4. O bloqueio da biossíntese de esteróides em COCs bovinos durante a MIV afeta adversamente a maturação oocitária [49].

Há poucos relatos na literatura de estudos que avaliaram a esteroidogênese do COCs bovinos durante a MIV e os resultados são conflitantes [49-51]. A produção de estradiol por COCs bovinos cultivados durante 24 horas de MIV em meio TCM-199 suplementado com BSA ou soro reportada por Mingoti et al (2002) foi de 128,5 ng/ml/10 COCs/3 ml de meio de MIV [50] e por Wang et (2006) foi de 140 ng/ml/5 COCs/100 µl de meio [49]. Inversamente, nossos resultados demonstram pequena secreção de E2 (270 pg/ml/40 COCs/400 µl) no meio TCM suplementado com 10% de soro. As razões para estas discrepâncias na secreção de E2 entre os estudos são desconhecidas, mas devem incluir diferenças metodológicas, como a densidade de COCs por ml de meio, suplementos e/ou fonte de soro. Contudo, pelo efeito do soro nas CG como indutor de luteinização *in vitro* se espera que a produção de E2 seja baixa. As concentrações de P4 (20 a 30 ng/ml) obtidas nestes estudos foram similares e não diferiram dos nossos resultados. Em adição, Schuetz et al (1992) observaram que diferentes tipos de soro utilizados no cultivo *in vitro* de COCs humanos variam marcadamente em seu conteúdo hormonal e podem afetar diferencialmente a secreção de hormônios pelos COCs durante a cultura [52].

Embora o estradiol seja rotineiramente adicionado ao meio de MIV em alguns protocolos experimentais, geralmente em doses farmacológicas, os efeitos deste esteróide na maturação do oócito permanecem controversos [10, 53-55]. Além disso, não está claro se a suplementação com estradiol exógeno é adequada e necessária para o cultivo do oócito, uma vez que a secreção deste esteróide tem sido demonstrada em culturas *in vitro* de CG murais e CC de várias espécies, como em humano [52, 56], rato [57], bovino [50, 51], ovino [30] e suíno [58]. Um papel estabelecido do estradiol é promover alterações na reatividade do sistema de liberação do cálcio durante a maturação citoplasmática do oócito [59], o qual permite a típica oscilação do cálcio durante a fertilização [60]. Também tem sido descrito que

o estradiol inibe a apoptose induzida por estresse oxidativo em células ovarianas [61]. No entanto, ainda se sabe muito pouco sobre os efeitos genômicos e não genômicos dos esteróides foliculares em oócitos de mamíferos [59]. A suplementação do meio de cultura com compostos biológicos tem demonstrado ser vantajosa para o desenvolvimento do embrião *in vitro*. O soro e BSA são comumente utilizados como fonte protéica nos meios de cultura de oócitos e embriões de mamíferos. Entretanto, estes compostos podem introduzir contaminantes nos meios de cultura, como esteróides, colesterol, peptídeos, além de agentes bacterianos e virais [9, 49, 62]. Para evitar interferências na repetibilidade de resultados e o risco de contaminação biológica dos embriões alguns estudos têm sido desenvolvidos empregando sistemas de cultura definidos. Nossos resultados demonstram que os índices de embriões produzidos *in vitro* foram similares nos dois sistemas de MIV avaliados (com e sem soro), o que indica que a supressão do soro durante a MIV não compromete o potencial para o desenvolvimento pós-clivagem do oócito. Tem sido sugerido que o PVA e o PVP-40 podem substituir as albuminas [10] e o soro na maturação *in vitro* de oócitos bovinos sem comprometer o desenvolvimento pré-implantação [11-16]. Estudos prévios demonstraram que o PVP não é somente um substituto adequado para o soro, mas é benéfico para a MIV e está associado a aumento da qualidade do embrião [7, 63]. Em adição, Hirao et al (2004) [17] reportam que meio de cultura suplementado com PVP suporta o crescimento de complexos cumulus-oócito bovinos e o desenvolvimento do oócito. O PVP parece diferir do PVA em algumas propriedades como peso molecular, solubilidade e pH [17]. No entanto, a suplementação do meio  $\alpha$ -MEM com PVA ou PVP-40 não influenciou distintamente a esteroidogênese e a proporção E2:P4 secretados pelas CC e nem a maturação do oócito, observamos apenas uma discreta redução na produção de progesterona no meio de cultura suplementado com o PVP-40. De acordo com o nosso conhecimento, não há relatos na literatura de estudos que compararam a influência destas duas macromoléculas na esteroidogênese de CCOs durante a MIV. Quanto ao suporte hormonal, a insulina e o IGF-I estimularam a maturação oocitária e a produção de E2 por CC na ausência de FSH, o que demonstra a ação gonadotrófica destes fatores. De fato, vários estudos reportam que ambos, IGF-I e insulina, atuam na esteroidogênese e maturação oocitária *in vitro* [23, 24, 33, 60, 64].

Considerando que o estabelecimento da dominância folicular é coincidente com mudanças no sistema IGF-I/IGFBPs ovariano, com aumento na biodisponibilidade de IGF-I e menor dependência do FSH no folículo pré-ovulatório, é possível que esta gonadotrofina não seja obrigatória para o processo de maturação *in vitro* do oócito. No entanto, uma investigação mais detalhada é necessária para determinar o papel do IGF-I e da insulina na maturação de oócitos bovinos.

Em conclusão, os resultados deste estudo demonstram que as COCs bovinos cultivados em meio  $\alpha$ -MEM, suplementado com PVA ou PVP-40 e IGF-I/ insulina em doses fisiológicas secretam esteróides durante a MIV com alta capacidade de aromatização das CC e indicam que oócitos bovinos podem ser maturados neste sistema de MIV, sem alterar o desenvolvimento pós-clivagem. Este sistema de cultura pode ser adequado para o estudo do suporte hormonal para o oócito durante o cultivo e para a investigação da sinalização oócito-CC e da esteroidogênese de COCs bovinos durante MIV.

### **Agradecimentos**

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP. Os autores agradecem à Maria Albina Verceze Bortolheiro pelas dosagens hormonais, ao Frigorífico Barra Mansa – Sertãozinho/SP pelo fornecimento dos ovários bovinos, à Vitrogen pelo apoio técnico e ao laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite-CNPGL pelo fornecimento do soro de vaca em estro (OCS).

### **Referências Bibliográficas**

1. Fulka J, Jr., First NL, Moor RM. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol Hum Reprod.* 1998 Jan;4(1):41-9.
2. Aktas H, Leibfried-Rutledge ML, First NL. Meiotic state of bovine oocytes is regulated by interactions between cAMP, cumulus, and granulosa. *Mol Reprod Dev.* 2003 Jul;65(3):336-43.

3. Ali A, Coenen K, Bousquet D, Sirard MA. Origin of bovine follicular fluid and its effect during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*. 2004 Dec;62(9):1596-606.
4. Coleman NV, Shagiakhmetova GA, Lebedeva IY, Kuzmina TI, Golubev AK. In vitro maturation and early developmental capacity of bovine oocytes cultured in pure follicular fluid and supplementation with follicular wall. *Theriogenology*. 2007 Mar 15;67(5):1053-9.
5. Pavlok A, Lapatitis G, Cech S, Kubelka M, Lopatarova M, Holy L, et al. Simulation of intrafollicular conditions prevents GVBD in bovine oocytes: a better alternative to affect their developmental capacity after two-step culture. *Mol Reprod Dev*. 2005 Jun;71(2):197-208.
6. Russell DF, Baqir S, Bordignon J, Betts DH. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Mol Reprod Dev*. 2006 Oct;73(10):1255-70.
7. Sirard MA, Coenen K. The co-culture of cumulus-enclosed bovine oocytes and hemi-sections of follicles: Effects on meiotic resumption. *Theriogenology*. 1993 Nov;40(5):933-42.
8. Thompson JG. The impact of nutrition of the cumulus oocyte complex and embryo on subsequent development in ruminants. *J Reprod Dev*. 2006 Feb;52(1):169-75.
9. Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First NL, Parrish JJ, Memili E. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Anim Reprod Sci*. 2007 Oct;101(3-4):225-40.
10. Ali A, Sirard MA. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol Reprod*. 2002 Apr;66(4):901-5.
11. Downs SM, Dow MP, Fagbohun CF. The meiotic response of cumulus cell-enclosed mouse oocytes to follicle-stimulating hormone in the presence of different macromolecules. *J Exp Zool*. 1991 Jun;258(3):373-83.
12. Keskinetepe L, Brackett BG. In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol Reprod*. 1996 Aug;55(2):333-9.

13. Lonergan P, Fair, T, Gordon, I, editor. Effect of time of transfer to granulosa cell monolayer and cell-stage at 48 hours post-insemination on bovine oocyte development following IVM/IVF/IVC. Proceedings of the Eighth Conference of European Embryo Transfer Association; 1992; Lyon.
14. Mizushima S, Fukui Y. Fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined maturation medium. *Theriogenology*. 2001 Apr 15;55(7):1431-45.
15. Monaghan P CC, Lonergan P, Sharif H, Wahid H, Gordon I. The effect of maturation time on the subsequent in vitro development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 1993;39:370.
16. Watson AJ, De Sousa P, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J, et al. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biol Reprod*. 2000 Feb;62(2):355-64.
17. Hirao Y, Itoh T, Shimizu M, Iga K, Aoyagi K, Kobayashi M, et al. In vitro growth and development of bovine oocyte-granulosa cell complexes on the flat substratum: effects of high polyvinylpyrrolidone concentration in culture medium. *Biol Reprod*. 2004 Jan;70(1):83-91.
18. Matsudo T, Ogawa K, Kokufuta E. Complex formation of protein with different water-soluble synthetic polymers. *Biomacromolecules*. 2003 Nov-Dec;4(6):1794-9.
19. Ali A, Paradis F, Vigneault C, Sirard MA. The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev* 2005;71(3):358-67.
20. Anderiesz C, Ferraretti A, Magli C, Fiorentino A, Fortini D, Gianaroli L, et al. Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development in vitro. *Hum Reprod*. 2000 May;15(5):1140-8.
21. Beker-van Woudenberg AR, Zeinstra EC, Roelen BA, Colenbrander B, Bevers MM. Developmental competence of bovine oocytes after specific inhibition of MPF kinase activity: effect of estradiol supplementation and follicle size. *Anim Reprod Sci*. 2006 May;92(3-4):231-40.
22. Dode MA, Graves C. Involvement of steroid hormones on in vitro maturation

of pig oocytes. *Theriogenology*. 2002 Jan 15;57(2):811-21.

23. Makarevich AV, Markkula M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biol Reprod*. 2002 Feb;66(2):386-92.

24. Shimizu T, Murayama C, Sudo N, Kawashima C, Tetsuka M, Miyamoto A. Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. *Anim Reprod Sci*. 2007 Apr 18.

25. Singh B, Armstrong DT. Insulin-like growth factor-1, a component of serum that enables porcine cumulus cells to expand in response to follicle-stimulating hormone in vitro. *Biol Reprod*. 1997 Jun;56(6):1370-5.

26. Guler A, Poulin N, Mermillod P, Terqui M, Cognie Y. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. *Theriogenology*. 2000 Jul 15;54(2):209-18.

27. Kiapekou E, Loutradis D, Drakakis P, Zapanti E, Mastorakos G, Antsaklis A. Effects of GH and IGF-I on the in vitro maturation of mouse oocytes. *Hormones (Athens)*. 2005 Jul-Sep;4(3):155-60.

28. Goud PT, Goud AP, Qian C, Laverge H, Van der Elst J, De Sutter P, et al. In-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. *Hum Reprod*. 1998 Jun;13(6):1638-44.

29. Adashi EY, Resnick CE, Payne DW, Rosenfeld RG, Matsumoto T, Hunter MK, et al. The mouse intraovarian insulin-like growth factor I system: departures from the rat paradigm. *Endocrinology*. 1997 Sep;138(9):3881-90.

30. Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R. Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. *J Reprod Fertil*. 1996 Jan;106(1):7-16.

31. Giudice LC, Dsupin BA, Irwin JC, Eckert RL. Identification of insulin-like growth factor binding proteins in human oviduct. *Fertil Steril*. 1992 Feb;57(2):294-301.

32. Gutierrez CG, Campbell BK, Webb R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol*

Reprod. 1997 Mar;56(3):608-16.

33. Spicer J, Chamberlain C, Maciel S. Influence of gonadotropins on insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. *Dom Anim Endocrinol* 2002;22:237-54.

34. Bar-Ami S, Gitay-Goren H, Brandes JM. Different morphological and steroidogenic patterns in oocyte/cumulus-corona cell complexes aspirated at in vitro fertilization. *Biol Reprod.* 1989 Oct;41(4):761-70.

35. Lucidi P, Bernabo N, Turriani M, Barboni B, Mattioli M. Cumulus cells steroidogenesis is influenced by the degree of oocyte maturation. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003 May 28;1:45.

36. Kemper Green CN, Hawkins DA, Rocha A, Tanner JW, Harms PG, Forrest DW, et al. Temporal aspects of ovarian follicular growth and steroidogenesis following exogenous follicle-stimulating hormone in Angus heifers. *Anim Reprod Sci.* 1996 Dec 16;45(3):157-76.

37. Crowe MA, Kelly P, Driancourt MA, Boland MP, Roche JF. Effects of follicle-stimulating hormone with and without luteinizing hormone on serum hormone concentrations, follicle growth, and intrafollicular estradiol and aromatase activity in gonadotropin-releasing hormone-immunized heifers. *Biol Reprod.* 2001 Jan;64(1):368-74.

38. Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod.* 1988 Jun;38(5):1171-80.

39. Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. In: the proceedings of CAB International. London, UK Cambridge University Press; 1994.

40. Rosenkrans CF, Jr., First NL. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. *J Anim Sci.* 1994 Feb;72(2):434-7.

41. Gutiérrez CG, Oldham J, Bramley TA, Campbell BK, Gong JG, Webb R. Effect of nutrition on ovarian follicular recruitment in cattle. *J Anim Sci* 1995;73(1):230.

42. Erickson GF, Garzo VG, Magoffin DA. Insulin-like growth factor-I regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989 Oct;69(4):716-24.

43. Rodgers RJ. Steroidogenic cytochrome P450 enzymes and ovarian steroidogenesis. *Reprod Fertil Dev.* 1990;2(2):153-63.
44. Wrathall JH, Knight PG. Production of immunoactive inhibin by bovine granulosa cells in serum-free culture: effects of exogenous steroids and FSH. *Domest Anim Endocrinol.* 1993 Oct;10(4):289-304.
45. Picton HM, Campbell BK, Hunter MG. Maintenance of oestradiol production and expression of cytochrome P450 aromatase enzyme mRNA in long-term serum-free cultures of pig granulosa cells. *J Reprod Fertil.* 1999 Jan;115(1):67-77.
46. Fortune JE, Rivera GM, Evans AC, Turzillo AM. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod.* 2001 Sep;65(3):648-54.
47. Irving-Rodgers HF, Krupa M, Rodgers RJ. Cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression and the concentrations of steroid hormones in the follicular fluids of different phenotypes of healthy and atretic bovine ovarian follicles. *Biol Reprod.* 2003 Dec;69(6):2022-8.
48. Carson RS, Trounson AO, Findlay JK. Successful fertilisation of human oocytes in vitro: concentration of estradiol-17 beta, progesterone and androstenedione in the antral fluid of donor follicles. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982 Oct;55(4):798-800.
49. Wang HF, Isobe N, Kumamoto K, Yamashiro H, Yamashita Y, Terada T. Studies of the role of steroid hormone in the regulation of oocyte maturation in cattle. *Reprod Biol Endocrinol.* 2006;4:4.
50. Mingoti GZ, Garcia JM, Rosa-e-Silva AAM. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids. *Anim Reprod Sci.* 2002 Feb 15;69(3-4):175-86.
51. Schoenfelder M, Schams D, Einspanier R. Steroidogenesis during in vitro maturation of bovine cumulus oocyte complexes and possible effects of tri-butyltin on granulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003 Feb;84(2-3):291-300.
52. Schuetz AW, Dubin NH, Kwon H, Rock J, Damewood M, Ghodgaonkar R. Effects of human serum on rat cumulus-oocyte complex functions in vitro: oocyte activation and endocrine secretions. *J Assist Reprod Genet.* 1992 Apr;9(2):133-8.
53. Beker AR, Colenbrander B, Bevers MM. Effect of 17beta-estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology.* 2002 Dec;58(9):1663-73.



54. Lattanzi ML, Santos CB, Mudry MD, Baranao JL. Exposure of bovine oocytes to the endogenous metabolite 2-methoxyestradiol during in vitro maturation inhibits early embryonic development. *Biol Reprod.* 2003 Dec;69(6):1793-800.
55. Moreira F, Paula-Lopes FF, Hansen PJ, Badinga L, Thatcher WW. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology.* 2002 Jan 15;57(2):895-907.
56. Chian RC, Ao A, Clarke HJ, Tulandi T, Tan SL. Production of steroids from human cumulus cells treated with different concentrations of gonadotropins during culture in vitro. *Fertil Steril.* 1999 Jan;71(1):61-6.
57. Sherizly I, Kraicer PF. Progesterone secretion by the postovulatory rat cumulus. *Gamete Res.* 1980;3:115-9.
58. Channing CP, Bae IH, Stone SL, Anderson LD, Edelson S, Fowler SC. Porcine granulosa and cumulus cell properties. LH/hCG receptors, ability to secrete progesterone and ability to respond to LH. *Mol Cell Endocrinol.* 1981 Jun;22(3):359-70.
59. Tesarik J, Mendoza C. Direct non-genomic effects of follicular steroids on maturing human oocytes: oestrogen versus androgen antagonism. *Hum Reprod Update.* 1997 Mar-Apr;3(2):95-100.
60. Herbert M, Gillespie JI, Murdoch AP. Development of calcium signalling mechanisms during maturation of human oocytes. *Mol Hum Reprod.* 1997 Nov;3(11):965-73.
61. Murdoch WJ. Disruption of cellular associations within the granulosa compartment of periovulatory ovine follicles: relationship to maturation of the oocyte and regulation by prostaglandins. *Cell Tissue Res.* 1988 May;252(2):459-62.
62. Wang WH, Abeydeera LR, Cantley TC, Day BN. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by in vitro fertilization. *J Reprod Fertil.* 1997 Sep;111(1):101-8.
63. Chung JT, Tosca L, Huang TH, Xu L, Niwa K, Chian RC. Effect of polyvinylpyrrolidone on bovine oocyte maturation in vitro and subsequent fertilization and embryonic development. *Reprod Biomed Online.* 2007 Aug;15(2):198-207.

64. Spicer LJ, Alpizar E, Echtenkamp SE. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. *J Anim Sci.* 1993 May;71(5):1232-41.

# 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](#)