

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias

**TAXAS DE CLIVAGEM E DE FORMAÇÃO DE BLASTOCISTOS BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO* APÓS A ADIÇÃO DE OÓCITOS DESNUDOS AO
SISTEMA DE MATURAÇÃO**

Autor: Natalia Schmidt Arruda
Dissertação apresentada como
requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de
Reprodução Animal –
Biotécnicas de Reprodução
Orientador: Prof. Dr. José Luiz
Rodrigues

Porto Alegre, 16 de dezembro de 2010.

Natalia Schmidt Arruda
TAXAS DE CLIVAGEM E DE FORMAÇÃO DE BLASTOCISTOS BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO* APÓS A ADIÇÃO DE OÓCITOS DESNUDOS AO
SISTEMA DE MATURAÇÃO

APROVADO POR

Prof. Dr. José Luiz Rodrigues
Orientador e Presidente da Comissão

Profa. Dra. Adriana Bos Mikich
Membro da Comissão - UFRGS

Prof. Dr. Alexandre Tavares Duarte de Oliveira
Membro da Comissão - UFCSPA

Prof. Dr. Rui Fernando Félix Lopes
Membro da Comissão - UFRGS

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas e energias positivas que estiveram presentes na minha vida durante este período.

Ao professor, orientador, amigo e meu segundo pai Prof. Dr. José Luiz Rodrigues. Agradeço por todos os momentos de incentivo e dedicação ao meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal durante toda a nossa convivência. Por todo aprendizado proporcionado.

Ao Programa de Pós – Graduação em Ciências Veterinárias e a Faculdade de Veterinária da UFRGS pela oportunidade e manutenção da infra – estrutura para realizar os experimentos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela excelência nos seus docentes e formação profissional.

Ao Programa de bolsas Capes, o qual foi de extrema importância para a realização deste trabalho.

A toda a minha família.

Aos meus pais, João Francisco e Maria Elisa, pelos ensinamentos de caráter, seriedade e perseverança. Pelo grande apoio, emocional e financeiro, durante toda minha formação acadêmica e profissional.

As minhas irmãs. À Letícia pelo auxílio na execução deste trabalho enquanto bolsista do Laboratório de Embriologia, pela alegria e pensamentos positivos. À Beatriz pelos abraços carinhosos e momentos de felicidade.

À minha avó por seu carinho acolhedor, sabedoria e auxílio de todas as maneiras.

À Mariza por sua amizade de irmã, prestatividade e por permitir a convivência com o querido Lucas.

Aos poucos, mas grandes, amigos sempre presentes André C. Dalto, Paula S. Gonzalez, José Pedro A. V. Rocha e Otávio P. Sicco que além da amizade auxiliou na execução deste trabalho enquanto bolsista do Laboratório de Embriologia.

Aos colegas de trabalho no Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução que proporcionaram uma convivência agradabilíssima, além de importantes ensinamentos. Começando pelos quais convivi durante a

graduação: Fabiana Forell, Arnaldo D. Vieira, Lucila C. dos Santos, Cristiano Feltrin, Cláudia Antonioli, Rafael Rodrigues, Paula Rodriguez, Luis Felipe Steigleder, Alexandre A. V. Costa e Luis Felipe Ledur; e terminando com os quais convivi durante o mestrado: Daniela S. Scherer, Andréa Gallupo, Sabrina L. Lorenzoni, Zilah Cheuiche e Rafael Ruggieri.

A Dona Leda e o Sr. João pelo auxílio e, principalmente, pela alegria diária.

Ao Med. Vet. Frederico L. Schmitt pela amizade, confiança e importantes ensinamentos profissionais.

Ao amigo Márcio Aginsky pelos ensinamentos práticos e grande carinho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do co-cultivo de CCOs intactos com DOs durante a maturação <i>in vitro</i> em gotas de 50 μ L.....	29
Tabela 2. Avaliação do efeito de dois procedimentos de adição dos DOs aos CCOs intactos durante a maturação <i>in vitro</i>	30

ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma (s)
µL	microlitro (s)
µm	micrometro (s)
µM	micromolar (s)
° C	graus Celsius
%	por cento
BSA	albumina sérica bovina
BMP-15	proteína óssea morfogenética (<i>bone morphogenetic protein 15</i>)
CC	célula do <i>cummulus</i>
CCO	complexo <i>cummulus oophorus</i>
CCOs	complexo <i>cummuli oophorus</i>
CG	célula da granulosa
CIV	cultivo <i>in vitro</i>
CO ₂	gás carbônico
DNA	ácido desoxirribonucléico
EGF	fator de crescimento epidérmico (<i>epidermal growth factor</i>)
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina (<i>insulin like growth factor</i>)
FF	fluido folicular
FIV	fecundação <i>in vitro</i>
FSH	hormônio folículo estimulante
FSOs	fatores secretados pelos oócitos
g	grama (s)
GDF-9	fator de crescimento e diferenciação 9 (<i>growth-differentiation factor 9</i>)
hCG	gonadotrofina coriônica humana
HEPES	4-(2-hidroxiethyl) piperazina-1-ácido etanosulfônico (4-(<i>2-hydroxyethyl</i>) <i>piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>)
IA	inseminação artificial

LH	hormônio luteinizante
M	molar
MII	metáfase II
mg	miligrama (s)
MIV	maturação <i>in vitro</i>
mL	mililitro (s)
mm	milímetro (s)
mM	milimolar (s)
O ₂	oxigênio
ODs	ócitos desnudos
PBS	solução salina fosfatada
PIVE	produção <i>in vitro</i> de embriões
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
SFB	soro fetal bovino
SOF	fluido sintético de oviduto (<i>synthetic oviduct fluid</i>)
SVE	soro de vaca em estro
TCM 199	meio de cultivo para tecidos 199 (<i>tissue culture medium 199</i>)
TE	transferência de embriões

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3	ARTIGO.....	20
3.1	Resumo.....	20
3.2	Abstract.....	22
3.3	Introdução.....	24
3.4	Materiais e Métodos.....	25
3.4.1	Delineamento experimental.....	25
3.4.2	Obtenção dos oócitos.....	26
3.4.3	Maturação in vitro.....	26
3.4.4	Fecundação in vitro	27
3.4.5	Cultivo in vitro.....	28
3.4.6	Análise estatística.....	28
3.5	Resultados.....	28
3.6	Discussão.....	30
3.7	Conclusão.....	33
3.8	Referências.....	34
4	PERSPECTIVAS.....	37
5	REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO.....	38

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia reprodutiva é uma das áreas que contribui para o desenvolvimento da indústria animal, acelerando a seleção e o melhoramento genético. A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é um conjunto de procedimentos realizados em laboratório, incluindo etapas de maturação, fecundação e cultivo, pelos quais oócitos imaturos são utilizados para a produção de embriões. Thibier (1990) relata que na cronologia das biotécnicas de reprodução a produção de embriões totalmente *in vitro* desenvolvidas a partir de oócitos de ovários obtidos em abatedouro, foi incorporada à produção animal depois da inseminação artificial (IA) e da transferência de embriões (TE).

Por serem ferramentas para multiplicação de genótipos superiores, existe uma associação e certa dependência entre uso de biotécnicas reprodutivas utilizando-se animais melhoradores com o avanço genético dos rebanhos, o aumento da produtividade e a redução do custo de produção. Ao contrário de técnicas como a IA e a TE convencional, o uso da PIVE em escala comercial ainda é um fenômeno recente, o que torna difícil a avaliação de seu impacto na produção animal. Entretanto, já em 1989, Gearheart *et al.* acreditavam ser provável que a PIVE, por maximizar a produção de descendentes por doadora, tivesse efeitos no progresso genético e produção animal mais acentuados que os relatados pelo uso da TE.

Em 1982 nasceu o primeiro terneiro obtido a partir de um oócito maturado *in vivo*, fecundado *in vitro* com sêmen fresco e imediatamente transferido para o oviduto da receptora (Brackett *et al.*, 1982). Fukuda *et al.* (1990) reportaram o nascimento ocorrido em 1987 do primeiro terneiro produzido totalmente *in vitro*.

Segundo o estudo retrospectivo realizado por Viana *et al.* (2010), até o final da década de 90, a PIVE no Brasil era uma atividade basicamente restrita a laboratórios de pesquisa e sem expressão comercial. Por ser um processo tecnicamente complexo e com elevado custo, acreditava-se que a produção de

embriões em laboratório seria utilizada de forma moderada, ocupando apenas uma pequena parte do mercado. Entretanto, em um período de apenas cinco anos o país tornou-se o maior produtor mundial e referência no uso de PIVE em bovinos. Após 2004, a PIVE tornou-se a técnica de eleição para a produção de embriões em raças zebuínas, levando o mercado nacional para um novo patamar (>200.000 embriões produzidos/ano). Em 2008 nosso país produziu mais de 280.000 embriões, número que representa 26,9% da produção mundial. Considerando-se somente a PIVE este percentual sobe para 66,6% (aproximadamente 220.000 embriões) (Viana *et al.*, 2010).

De acordo com Viana *et al.* (2010), a expansão da PIVE no Brasil deve-se a três fatores principais: 1) contornou parte das limitações da TE em raças zebuínas; 2) propiciou uma produção em larga escala; 3) profissionais já possuíam experiência prévia com o uso da produção *in vivo* de embriões.

Apesar dos avanços nos principais procedimentos da PIVE, como maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), quando comparada ao processo *in vivo* é inferior, pois a porcentagem de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto raramente ultrapassa 50% (Leibfried *et al.*, 1987; Hussein *et al.*, 2006). Segundo Gilchrist *et al.* (2010), um dos principais fatores que afeta esta taxa é a incompetência do oócito em realizar a maturação. Marquant-Leguienne e Humblot (1998) já destacavam que a identificação e o controle dos fatores de variação dos sistemas de PIVE, proporcionam um aumento da eficiência técnica, com importante significado econômico.

De acordo com Thompson *et al.* (2007) atualmente diferentes sistemas de PIVE são empregados para produzir embriões a partir de oócitos imaturos, levando-se em consideração objetivos científicos e de aplicação prática. A PIVE de bovinos alcança taxas médias entre 20 e 40% de desenvolvimento até o estágio de blastocisto.

O TCM 199 é o meio mais utilizado para maturação de oócitos e foi desenvolvido para suprir as necessidades metabólicas de células somáticas. Sutton *et al.* (2003 e 2005) afirmaram que a composição do líquido folicular difere significativamente dos meios utilizados para MIV, principalmente na concentração de glicose, sendo esta a principal fonte de energia para os Complexos *cummuli* – oócitos (CCOs). Esta diferença do processo *in vivo* é

uma das deficiências da PIVE, havendo necessidade do desenvolvimento de meios específicos para promover esta etapa com eficiência.

Segundo Gilchrist e Thompson (2007) os oócitos participam ativamente na regulação das funções das células somáticas ovarianas através de fatores secretados por oócitos (FSOs) durante a maturação. Estes fatores ainda não estão disponíveis no mercado, portanto não podem ser acrescentados diretamente ao meio. Uma alternativa para suplantar esta barreira é o co-cultivo com oócitos desnudos (ODs). Estes secretam os FSOs que proporcionam um ambiente mais adequado para o desenvolvimento embrionário, permitindo um aumento das taxas de blastocistos produzidos *in vitro*, com redução dos custos.

A fim de encontrar uma alternativa para contornar as dificuldades acima mencionadas, os objetivos deste trabalho foram determinar as taxas de clivagem (D2) e blastocistos (D7) produzidos *in vitro* a partir de oócitos maturados em sistema acrescido de oócitos desnudos e avaliar o efeito de dois procedimentos de adição dos DOs aos CCOs intactos durante a MIV.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A MIV dos oócitos de animais domésticos proporciona uma importante plataforma tecnológica para obtenção de cruzamentos artificiais, produção de células tronco-embrionárias, clonagem e produção de animais transgênicos.

Moor e Osborn (1983) destacaram que o procedimento de MIV era uma tentativa de estimular a aquisição fora do organismo materno da competência biológica dos oócitos, nos quais é necessária a ocorrência de modificações estruturais e bioquímicas. Segundo Gilchrist e Thompson (2007) a MIV envolve a remoção dos CCOs dos folículos antrais e o cultivo em meio base para células por períodos entre 22 e 28 horas, com a progressão da meiose até atingir a fase de metáfase II. De acordo com os autores somente um pequeno número dos oócitos coletados tem potencial para um desenvolvimento completo. A complexidade deste processo, que ainda não pôde ser mimetizado de forma totalmente adequada em laboratório, traduz-se por uma inabilidade dos oócitos em alcançar o estágio que os habilita à fecundação.

Leibfried *et al.* (1987) definiram a maturação oocitária como um conjunto de eventos, que tem início no rompimento da vesícula germinal e que se encerra na segunda divisão meiótica, com a maturação nuclear. Segundo Hytell *et al.* (1997) a maturação do oócito, após o seu crescimento, passa pelas fases de capacitação e maturação final. A capacitação, de acordo com os autores, identifica as alterações sofridas pelo oócito, quando sob a influência do folículo dominante, que são: redução da transcrição e tradução, o aumento das inclusões de substratos, a migração dos grânulos corticais para a periferia celular, o rompimento das junções gap e, ainda, a retração dos prolongamentos da corona radiata. De acordo com os mesmos autores, a maturação final caracteriza-se pelo alinhamento dos grânulos corticais paralelamente a membrana plasmática. Simultaneamente ocorre a condensação dos cromossomos, a migração de ribossomos para as proximidades dos mesmos e, finalmente a quebra da vesícula germinativa. Induzida pela ação do LH, a maturação final ocorre no folículo pré-ovulatório.

Yang (1997) entende que além das modificações intracelulares focalizadas por Hytell *et al.* (1997), alterações estruturais ocorrem na superfície do oócito durante a maturação. As células do *cummulus oophorus* apresentam maior espaço entre si, a zona pelúcida assemelha-se a uma malha fibrosa e as microvilosidades tornam-se estruturas predominantes na superfície do oócito.

Segundo Gilchrist e Thompson (2007) a eficiência da MIV também é limitada pela competência intrínseca de desenvolvimento do oócito, a qual se refere ao estado bioquímico e molecular que permite um oócito maturo ser fecundado e se desenvolver até o estágio de blastocisto. Aqueles de qualidade pobre resultam tanto em poliespermia quanto em não desenvolvimento embrionário ou aborto espontâneo (Gilchrist *et al.*, 2008).

A MIV difere da maturação *in vivo* em três importantes aspectos, primeiramente os CCOs são coletados de folículos de tamanhos variados onde a grande maioria ainda não completou a “capacitação oocitária”, portanto ainda não possuem a maquinaria molecular e celular necessária para dar suporte a embriogênese. O segundo aspecto é que a remoção mecânica dos CCOs dos folículos resulta em perda da inibição natural da meiose, levando a maturação espontânea dos oócitos *in vitro*. O reinício espontâneo da meiose ocorre através de uma cascata molecular intracelular diferente daquela que ocorre *in vivo* em resposta às gonadotrofinas ovarianas. Uma terceira diferença seria o processo de dominância folicular (Gilchrist e Thompson, 2007).

Segundo Hytell *et al.* (1997), o aumento do diâmetro interno dos oócitos na fase de crescimento é marcante, pois estruturas com menos de 30 μm atingem até 120 μm . Os mesmos autores caracterizam a fase de crescimento conforme as modificações estruturais que ocorrem no oócito, como a formação de novas organelas citoplasmáticas (retículos endoplasmáticos lisos, complexos de Golgi e mitocôndrias) e a organização da zona pelúcida e dos grânulos corticais. Os autores destacam que também é característico o fato de que as células da granulosa, que circundam o oócito, emitem prolongamentos que atravessam a zona pelúcida e a membrana plasmática estabelecendo comunicações entre os dois tipos celulares através de junções do tipo gap. Buccione *et al.* (1990a) concluem que a comunicação intercelular, entre oócito e células da granulosa, permite que substratos energéticos, nucleotídeos e

aminoácidos sejam introduzidos no oócito, proporcionando a nutrição necessária ao crescimento oocitário.

De acordo com Dong *et al.* (1996) e Simon *et al.* (1997), o ambiente folicular programa o desenvolvimento do oócito. O crescimento e o desenvolvimento do oócito são absolutamente dependentes da capacidade de nutrição do folículo, em particular das células da granulosa (CG). A comunicação entre as células germinativas e o compartimento das células somáticas ocorre via sinalização parácrina e junções do tipo gap. Ambas as formas de comunicação são essenciais para uma oogênese e foliculogênese normais. O CCO está totalmente rodeado por líquido folicular o qual fornece nutrientes e proporciona as trocas metabólicas necessárias para o desenvolvimento oocitário *in vivo*. Segundo Thompson (2006) a maturação e o cultivo *in vitro* estão associados com a diminuição da capacidade de desenvolvimento destas estruturas, sendo a falta de complexidade dos meios uma das justificativas para que isto ocorra. Podemos verificar esta possível capacitação incompleta observando uma significativa redução na taxa de sobrevivência após a transferência de embriões para fêmeas receptoras obtidas nos experimentos de Greve *et al.* (1993) e Schmidt *et al.* (1996) e/ou pelo nascimento de fetos com fenótipos anormais obtidos pelos grupos de Farin e Farin (1995) e Thompson *et al.* (1995). Estas anormalidades no fenótipo fetal mostram que o sistema *in vitro* cria um ambiente no qual fatores epigenéticos são acionados e manifestados. Além disso, os pesquisadores Thompson *et al.* (1995) e Sinclair *et al.* (1999) mostram que modificações na composição do ambiente *in vitro* podem influenciar na incidência de fenótipos fetais alterados. Estes trabalhos concluem que o ambiente encontrado pelo oócito e/ou embriões jovens tem um efeito importante no posterior desenvolvimento *in vivo*.

Para realizar a MIV se utilizam meios como Ham's F10 (Greve *et al.*, 1989) e TCM 199 (Bavister *et al.*, 1992; Hawak e Wall, 1994) podendo ser suplementados com soro fetal bovino (SFB), soro de vaca em estro (SVE) ou albumina sérica bovina (BSA). De acordo com Gilchrist e Thompson (2007) os meios de cultivo utilizados para MIV são meios originalmente desenvolvidos para o cultivo de células somáticas e de tecidos. Este é o caso do TCM 199, o meio mais utilizado para maturação de oócitos. Este foi desenvolvido para

suprir as necessidades metabólicas de células somáticas e não para as complexas e dinâmicas necessidades dos CCOs para a atingirem a completa maturação. Esta é uma deficiência da MIV, havendo necessidade do desenvolvimento de um meio específico para este sistema de cultivo (Hussein *et al.*, 2006).

Está claro que a composição do fluido folicular (FF) varia significativamente dos meios normalmente utilizados (Sutton *et al.*, 2005), mais notavelmente na concentração de glicose, a qual é a maior fonte de energia para os CCOs. Segundo Takagi *et al.* (1998) o FF já foi utilizado na MIV de oócitos bovinos, proporcionando uma maior expansão das CC. Por outro lado, houve uma maior incidência de inibição meiótica, fenômeno não observado quando oócitos foram maturados em meio comercial.

De acordo com Eppig (2001) a dependência da íntima associação entre oócitos e células somáticas foliculares já está comprovada. Os oócitos necessitam desta associação para atingir seu completo crescimento, adquirir competência para o desenvolvimento e concluir a maturação nuclear e citoplasmática. Já em 1935, Pincus e Enzmann descobriram que oócitos removidos de folículos antrais e cultivados *in vitro* reativavam a meiose espontaneamente, independentemente do aporte hormonal gonadotrófico. Através desta observação puderam concluir que as células somáticas foliculares mantinham o oócito em meiose. Em 1990 (a) Buccione *et al.* descobriram que as células foliculares ainda promoviam a competência do oócito para a fecundação. Subsequentemente, De La Fuente e Eppig (2001) descobriram que as células da granulosa participavam na supressão global da transcrição, que ocorre após a maturação nuclear.

Os estudos pioneiros do grupo de pesquisadores orientados por Nalbandov já mostraram, em 1970, uma luteinização prematura de folículos antrais de coelhas *in vivo* após a aspiração dos CCOs (El-Fouly *et al.*, 1970). O cultivo das CG em proximidade com os oócitos parecia diminuir a luteinização quando comparado com aquelas cultivadas sem a presença de oócitos *in vitro* (Nekola e Nalbandov, 1971). Estes autores foram os primeiros a propor que oócitos secretam fatores que atuam na prevenção da luteinização das células foliculares. Este conceito foi essencialmente ignorado por duas décadas subsequentes, até quatro estudos emergirem no mesmo ano, em 1990, onde

todos mostravam o conceito de que os oócitos têm a capacidade de regular as funções das CGs ou CCs *in vitro* (Buccione *et al.*, 1990 a; Salustri *et al.*, 1990 a e b; Vanderhyden *et al.*, 1990). Estudos posteriores verificando a ação dos FSOs vieram firmar o estabelecimento do conceito de que há uma via bi – direcional de comunicação importante entre o oócito de mamíferos e suas células somáticas (Buccione *et al.*, 1990 b; Joyce *et al.*, 1999; Vanderhyden *et al.*, 1992; Gilchrist *et al.*, 2001, 2006; Eppig *et al.*, 2002; Hussein *et al.*, 2005).

Nas últimas décadas, este novo conceito na biologia reprodutiva vem sendo defendido e de acordo com Eppig (2001) e Gilchrist *et al.* (2004) os oócitos participam ativamente na regulação das funções das células somáticas ovarianas. Os oócitos atuam primeiramente secretando FSOs, os quais pertencem a superfamília dos TGF β , onde o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF 9) e a proteína óssea morfogenética 15 (BMP 15) parecem ser os mais importantes. Dois estudos de referência mostraram que a ausência destes dois fatores de crescimento oócito-específico pode causar esterilidade (Dong *et al.*, 1996; Galloway *et al.*, 2000). Estas moléculas são reguladores centrais da diferenciação CG e CC, podendo ser alvos potenciais contraceptivos e serem associados com a patogênese da disfunção ovariana (Gilchrist *et al.*, 2004; Shimasaki *et al.*, 2004; Juengel e McNatty., 2005 e McNatty *et al.*, 2007).

Os FSOs modulam grande parte das funções das CG e das CC. Estas funções estão associadas principalmente com crescimento e diferenciação celular. Estudos de diferentes grupos mostram que importantes funções das CG e CC são reguladas pelos FSOs, dentre elas estão a promoção de crescimento celular (Vanderhyden *et al.*, 1992; Gilchrist *et al.*, 2006) a prevenção da morte celular (Hussein *et al.*, 2005), a modulação da esteriodogênese (Li *et al.*, 2000; Vanderhyden *et al.*, 1993), a regulação da expansão das CC (Buccione *et al.*, 1990 b; Dragovic *et al.*, 2005) e o metabolismo das mesmas (Sutton *et al.*, 2003; Sugiura e Eppig., 2005). Os FSOs agem diretamente sobre os níveis de mRNA e sobre a atividade da ácido hialurônico sintetase 2 (Has 2).

Os oócitos não promovem somente o crescimento das células da granulosa (Vanderhyden *et al.*, 1992 e Gilchrist *et al.*, 2001) e do folículo, eles regulam também o processo de diferenciação, como a esteriodogênese que

remodela fisicamente o folículo (Vanderhyden *et al.*, 1992 e Eppig *et al.*, 2002). Oócitos de mamíferos crescem e se desenvolvem em uma íntima e mútua relação de dependência com as células somáticas adjacentes. O início do crescimento do oócito ocorre em folículos pré antrais onde os oócitos estão intimamente associados com células da granulosa relativamente indiferenciadas. Após a formação do antro folicular, o qual corresponde aproximadamente ao fim da fase de crescimento do oócito, as CG se diferenciam em duas linhagens anatomicamente e funcionalmente distintas: as CG murais e as CC. Segundo Albertini *et al.* (2001) as primeiras são a linha de células presente na parede folicular e apresentam a função estereidogênica principalmente, enquanto que as CC formam uma associação íntima com o oócito. Estas possuem projeções trans-zonais citoplasmáticas altamente especializadas que penetram na zona pelúcida e formam as junções do tipo gap, originando a elaborada estrutura chamada complexo cummulus oócito.

De acordo com Sutton *et al.* (2003) o alvo primário para a sinalização parácrina do oócito são as células do cummulus. A manutenção do fenótipo destas células é dependente da secreção dos oócitos (Eppig *et al.*, 1997 e Li *et al.*, 2000). Portanto, a sinalização parácrina pelo oócito é essencial para o normal funcionamento das células do cummulus, assim como para manter um gradiente morfogenético funcional pelo ovário e folículo.

De acordo com Gilchrist *et al.* (2008) os oócitos são potentes estimuladores da proliferação das CG e CC e da síntese de DNA. Além disso, os FSOs ainda promovem a mucificação e expansão das CC. Inicialmente, a expansão das CCs é dependente de dois eventos de sinalização. Primeiro, depende do estímulo feito pelas gonadotrofinas ou fatores de crescimento e segundo, da sinalização parácrina secretada pelo oócito chamada de fatores possibilitadores da expansão das CCs. Estes agem nas CC, possibilitando-as responder ao sinal proveniente das gonadotrofinas ou dos fatores de crescimento, sintetizando moléculas da matriz extracelular. O ácido hialurônico compõe a maior parte do esqueleto estrutural da matriz extracelular do cummulus, sendo este sintetizado pela enzima ácido hialurônico sintetase 2. Segundo Russell e Robker (2007) a mucificação e a expansão do CCO em resposta ao pico de LH é necessária para ovulação e, portanto, para fertilidade.

Uma vez formada a matriz extracelular do cummulus, os FSOs podem contribuir com a sua estabilidade através da prevenção da ação de proteases. O FSH induz a atividade da protease das células murais da granulosa, mas os FSOs contêm esta ação do FSH sobre o CCO através da inibição do “ativador de atividade do plasminogênio induzido pelo FSH” (Canipari *et al.*, 1995).

O trabalho realizado por Hussein *et al.*, em 2006, mostra que a capacidade dos oócitos imaturos de produzir estes fatores que regulam as funções das CC e CG, constitui um importante componente na competência de desenvolvimento do oócito. Este trabalho também revela que é possível obter um aumento das taxas de blastocisto, do número de células e da qualidade embrionária quando acrescentado ao meio de MIV alguns dos FSOs.

Vários estudos com diferentes modelos experimentais têm sido realizados para estudar os FSOs e cada um tem suas vantagens e limitações.

Estudos examinando animais que são geneticamente deficientes em GDF-9 e/ou BMP-15 tem nos fornecido informações importantes sobre o papel central destas moléculas secretadas pelos oócitos. Camundongas e ovelhas deficientes em GDF-9 (Dong *et al.*, 1996; Hanrahan *et al.*, 2004) ou ovelhas deficientes em BMP-15 (Galloway *et al.*, 2000) são estéreis devido a um completo bloqueio na foliculogênese no seu primeiro estágio, mostrando a necessidade da expressão destas moléculas pelo o oócito.

Como GDF-9 e BMP-15 foram recentemente descobertos há uma falta de fatores de crescimento recombinantes, anticorpos e imunoenaios confiáveis em escala comercial. A variação entre as preparações feitas em cada laboratório de GDF-9 e BMP-15 e a falta de controles experimentais e padrões adequados está gerando inconsistências entre laboratórios. Além disso, diferente da superfamília TGF β em geral, artefatos *in vitro* podem surgir quando preparações de GDF-9 e BMP-15 não homólogos recombinantes são utilizadas (ex: a produção de progesterona pelas CG de ovinos é inibida pelo GDF-9 recombinante de ovinos, mas aumentada pelo GDF-9 de camundongos - McNatty *et al.*, 2005).

Uma alternativa suplementar *in vitro* que se aproxima do uso de FSOs em formas recombinantes é o uso de FSOs nativos. Estes fatores são obtidos através do acréscimo de ODs imaturos ao meio de maturação. Estes secretarão os FSOs que ficarão disponíveis para o consumo dos CCOs.

Segundo Gilchrist *et al.* (2008), os experimentos com FSOs nativos têm uma distinta vantagem sobre o tratamento das CC com fatores de crescimento recombinantes, pois as CC são expostas simultaneamente a várias moléculas secretadas pelo oócito e os fatores de crescimento podem ser secretados de forma semelhante aquela que ocorre *in vivo*.

Para provar a prevenção da apoptose das CC pelos FSOs, Hussein *et al.* (2005) utilizaram FSOs nativos. Neste experimento os pesquisadores mostraram que a remoção do oócito das CC através de microcirurgia aumentava o número de CC apoptóticas e que isto era revertido através da exposição destas células aos FSOs. Os ODs, co-cultivados com CC, induziam uma supressão dose-dependente da apoptose das CC, tanto em complexos compactos quanto em expandidos por estímulo do FSH . Os oócitos previnem a apoptose através do estímulo da expressão de proteínas Bcl-2 anti apoptóticas e da supressão de proteínas Bax pró – apoptóticas nas CCs. O efeito anti apoptótico dos FSOs é tão potente que eles são capazes de conter os efeitos de um insulto apoptótico externo.

A fim de verificar as taxas de clivagem e blastocistos produzidos *in vitro* a partir de oócitos maturados em sistema acrescido de ODs e de avaliar o efeito de dois procedimentos de adição dos ODs aos CCOs intactos durante a MIV, realizamos este trabalho.

3. ARTIGO

TAXAS DE CLIVAGEM E DE FORMAÇÃO DE BLASTOCISTOS BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* APÓS A ADIÇÃO DE OÓCITOS DESNUDOS AO SISTEMA DE MATURAÇÃO

3.1 RESUMO

Apesar dos avanços nos procedimentos de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* a porcentagem de embriões produzidos capazes de se desenvolver até o estágio de blastocisto ainda é reduzida. Segundo Gilchrist *et al.* (2010) um dos principais fatores que afeta esta taxa de desenvolvimento embrionário é a incompetência do oócito em realizar a maturação. Com o objetivo de aumentar esta eficiência, têm-se estudado a interação entre fatores secretados pelos oócitos e a maturação oocitária. O objetivo deste experimento foi determinar as taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário até blastocisto, a partir de dois procedimentos de adição às gotas de MIV de oócitos desnudos (ODs). Os complexos *Cummuli* oócitos (CCOs) foram obtidos mediante punção de folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm. Os CCOs que apresentaram cummulus compacto e citoplasma homogêneo foram selecionados para maturação e desnudamento. Os CCOs foram maturados em gotas de 50 μ L de meio de maturação (Meio TCM 199 modificado) sob óleo mineral e incubados a 38,5 °C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade relativa saturada. Aqueles selecionados para serem desnudos, permaneceram em TCM Holding [Meio 199 modificado]. Os oócitos foram desnudos com o auxílio de uma pipeta de vidro estirada em fogo. Os CCOs permaneceram 9 horas em meio de maturação quando foram colocados em co-cultivo, respeitando-se a densidade de 0,5 ODs/ μ L. Parte dos CCOs foram postos nas gotas de maturação onde se encontravam os ODs (Grupo 1) e outra parte recebeu os ODs em suas gotas de maturação (Grupo 2). Os grupos Controle 50 μ L e Controle 100 μ L permaneceram em meio de maturação. Todos os grupos, experimentais e controles, permaneceram em maturação por 24

horas. A fecundação com sêmen reaquecido foi realizada durante 20 horas nas mesmas condições atmosféricas da maturação. As estruturas foram cultivadas em SOFm em gotas de 80 μ L, sob óleo mineral e foram mantidas a 38,3°C em estufa de cultivo com atmosfera de 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂ e umidade relativa saturada. As taxas de clivagem foram avaliadas em D2 enquanto as taxas de blastocisto foram avaliadas em D7. Foram realizadas seis repetições. Os resultados foram analisados aplicando-se o teste do Qui-quadrado, para P<0,05. As taxas de clivagem não diferiram entre os grupos (C 100 μ L: 68,53%; C 50 μ L: 69,56%; G 1: 66,19%; G 2: 68,05%). Porém comparação das taxas de blastocisto obtidas entre os grupos houve diferença significativa. O grupo 2 mostrou-se superior quando comparado ao grupo controle de 50 μ L (23,38% e 13,04%, respectivamente). Os demais grupos não diferiram entre si (C 100 μ L: 14,60%; G1: 18,30%). Os resultados nos permitem concluir que a adição de ODs que secretaram FSOs ao meio de maturação não alterou as taxas de clivagem, mas promoveu maiores taxas de desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto quando os ODs foram adicionados às gotas que já continham os CCOs.

3.2 ABSTRACT

CLIVAGE AND BLASTOCYST RATES AFTER ADDITION OF DENUDED OOCYTES IN MATURATION MEDIUM IN CATTLE

In vitro maturation of oocytes, fertilization and development of blastocysts has been achieved in several species, however the rate of blastocyst development is still limited. According Gilchrist *et al.* (2010) this efficiency is limited by the oocyte competence. To improve these results, some research groups have studied the interaction among factors secreted by oocytes and oocyte maturation. The aim of our experiments was to determine the cleavage and blastocyst rates, from two procedures of addition of denuded oocytes (DOs) to IVM droplets medium. The *Cumuli-oocyte* complexes (COC) were recovered by aspiration of 2 to 8mm follicles using a 18 G needle. Oocytes with a compact *Cumulus cells* (CC) and homogeneous cytoplasm were selected for maturation and denudation. The COC were matured in 50 μ L drops in TCM199 medium modified under mineral oil at 38.5°C in an humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Denuded oocytes were generated by removing CCs from COCs by repeated passage of the oocytes through a fire-pulled glass pipette. The COCs remained 9 hours in IVM when they were placed in co-culture, respecting the density of 0.5 DOs/ μ L. COCs were randomly allocated into 2 treatment groups during IVM: group 1, COCs were placed into maturation medium droplets in which there were the DOs; group 2, DOs received the COCs into their maturation medium droplet. All groups, experimental and control, remained into IVM medium for 24 hours. Fertilization was performed with frozen-thawed semen and the oocytes were incubated with sperm for 20 hours into the same atmospheric conditions of IVM. The presumptive zygots were *in vitro* cultured (IVC) in SOFm in an humidified atmosphere 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂. Cleavage rates were evaluated in D2 while the blastocyst rates were evaluated in D7 after insemination. Six replicates were realized. The results were analyzed applying the chi-square, for $P \leq 0.05$. The cleavage rates did not differed among

the groups C 100 μ L: 68.53%; C 50 μ L: 69.56%; G 1: 66.19%; G 2: 68.05%). However, there was a significant difference on blastocyst rate. Group 2 was better than control group 50 μ L (23.38% e 13.04%, respectively). The other groups did not differ from each other (C 100 μ L: 14.60%; G1: 18.30%). In conclusion, the addition of FSOs to maturation medium did not modified the cleavage rates, but promotes more efficiently embryo development rates to the blastocyst stage when DOs are added to the drops that already contained the COCs.

3.3 INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços nos procedimentos de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, quando comparados ao processo *in vivo*, a porcentagem de embriões produzidos capazes de se desenvolverem normalmente ainda é muito reduzida. Segundo Gilchrist *et al.* (2010) um dos principais fatores que afeta esta taxa é a competência do oócito em realizar a maturação. De acordo com os mesmos autores (Gilchrist e Thompson, 2007) somente um pequeno número dos oócitos coletados tem potencial para um desenvolvimento completo. Leibfried *et al.* (1987) definiram a maturação oocitária como um conjunto de eventos, que tem início no rompimento da vesícula germinal e que se encerra na segunda divisão meiótica, com a maturação nuclear. Segundo Gilchrist e Thompson (2007) a eficiência da MIV também é limitada pela competência intrínseca de desenvolvimento do oócito, a qual se refere ao estado bioquímico e molecular que permite um oócito maturo ser fecundado e se desenvolver até o estágio de blastocisto.

Os oócitos dependem da íntima associação com as células somáticas foliculares para atingir seu completo crescimento, adquirir competência para o desenvolvimento e concluir a maturação nuclear e citoplasmática. Nas últimas décadas um novo conceito na biologia reprodutiva vem sendo defendido. Segundo Eppig (2001) e Gilchrist *et al.* (2004) os oócitos participam ativamente na regulação das funções das células somáticas ovarianas. Os oócitos atuam primeiramente secretando fatores de crescimento solúveis (FSOs), os quais modulam grande parte das funções das células da granulosa (CG) e das células do *cumulus* (CC). Estas funções estão associadas com crescimento e diferenciação celular. Estudos de diferentes grupos mostram que importantes funções das CG e CC são reguladas pelos FSOs, dentre elas estão a promoção de crescimento celular (Vanderhyden *et al.*, 1992; Gilchrist *et al.*, 2006) a prevenção da morte celular (Hussein *et al.*, 2005), a modulação da esteroidogênese (Li *et al.*, 2000; Vanderhyden *et al.*, 1993), a regulação da expansão das CC (Buccione *et al.*, 1990; Dragovic *et al.*, 2005) e o metabolismo das mesmas (Sutton *et al.*, 2003; Sugiura e Eppig., 2005). Estes fatores ainda não estão disponíveis no mercado, portanto não podem ser

acrescidos diretamente ao meio de maturação. Uma alternativa para suplantar esta barreira é o co-cultivo com oócitos desnudos (ODs). Estes secretarão os FSOs que proporcionarão um ambiente mais adequado para o desenvolvimento embrionário, permitindo um aumento das taxas de blastocistos produzidos *in vitro*, com redução dos custos da PIVE.

Os objetivos deste trabalho foram determinar as taxas de clivagem (D2) e blastocistos (D7) produzidos *in vitro* a partir de oócitos maturados em sistema acrescido de oócitos desnudos e avaliar do efeito de dois procedimentos de adição dos ODs aos CCOs intactos durante a maturação *in vitro*.

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

Utilizaram-se produtos Sigma (St. Louis, MO, USA) testados para embriões, os quais serão identificados pelos respectivos números de catálogo. Todos os meios foram preparados com água purificada pelo sistema Elix/Milli-Q synthesis (Millipore, Bedford, MA, USA).

3.4.1 Delineamento experimental

Experimento 1: Efeito do co-cultivo de CCOs intactos com ODs durante a maturação *in vitro* em gotas de 50 μ L

Este experimento foi realizado para determinar o efeito de fatores secretados pelos oócitos na maturação, avaliando-se a taxa de clivagem (D2) e a taxa de blastocisto (D7). Foram realizadas três repetições.

Experimento 2: Avaliação do efeito de dois procedimentos de adição dos ODs aos CCOs intactos durante a maturação *in vitro*

O objetivo deste experimento foi determinar as taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário até blastocisto, a partir de dois procedimentos de adição de ODs às gotas de MIV. No grupo 1, os CCOs foram adicionados às gotas onde estavam os ODs enquanto que no grupo 2 os ODs foram adicionados às gotas que já continham os CCOs. Foram realizadas seis repetições. Os grupos foram realizados contemporaneamente.

3.4.2 Obtenção dos oócitos

Ovários bovinos foram coletados no frigorífico Rost (São Leopoldo-RS) e transportados até o laboratório em recipiente térmico contendo PBS modificado (PBSm), aquecido à 30 °C. Os CCOs bovinos foram recuperados mediante punção de folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm, com auxílio de uma agulha de 14G, acoplada a uma seringa descartável. O líquido folicular era transferido para placas de Petri de 90 mm onde se realizava a procura, sob estereomicroscópio (15x). Os CCOs foram transferidos para placas de Petri de 35 mm contendo TCM Holding [Meio 199 (M-2520) adicionado de 2,381 mM NaHCO₃ (S-5761) e 0,2mM piruvato de sódio (P-2256), 50 µg de Gentamicina e 10% de SFB] onde foram selecionados.

3.4.3 Maturação *In Vitro*

Os CCOs que apresentaram *cumulus oophorus* compacto e citoplasma homogêneo foram selecionados para maturação e desnudamento. Os CCOs foram maturados em gotas de 100 µL ou 50 µL de meio de maturação [Meio 199 adicionado de 26 mM NaHCO₃, 0,2mM piruvato de sódio, 50 µg de gentamicina, 0,5µg de FSHb/mL (Folltropin V, Vetrepharm), 0,5 µg de LH (Lutropin, Vetrepharm) e 10% de SFB], sob óleo mineral e incubados a 38,5 °C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e umidade relativa do ar saturada. Aqueles selecionados para serem desnudos, permaneceram em TCM Holding. Os oócitos foram desnudos com o auxílio de uma pipeta de vidro estirada em fogo.

Ambos os grupos de oócitos (com células do *cummulus* e desnudos) permaneceram 9 horas em meio de maturação quando foram colocados em co-cultivo, de acordo com Gilchrist e Thompson (2007).

No primeiro experimento os COCs eram transferidos para a gota de maturação onde os ODs se encontravam.

No experimento 2, parte dos CCOs foram postos nas gotas de maturação onde se ODs (Grupo 1) e outra parte recebeu os ODs em suas gotas de maturação (Grupo 2). A densidade utilizada de oócitos desnudos era de 0,5 ODs/ μ L de meio (Hussein *et al.*, 2006). O grupo Controle permaneceu em meio de maturação padrão do Laboratório. Todos os grupos permaneceram em maturação por 24 horas.

3.4.4 Fecundação *In Vitro*

Após a maturação, todos os grupos foram transferidos para gotas de 100 μ L de meio Fert-Talp (Parrish *et al.*, 1988). Uma hora antes do final do período de maturação, uma palheta de sêmen foi descongelada em banho-maria a 37 °C por 30 seg. Após o descongelamento o conteúdo da palheta foi fracionado e depositado sob 1,0 mL de meio SPERM Talp (Parrish *et al.*, 1988), em um tubo cônico de 15 mL mantido à 37 °C em estufa durante uma hora para seleção espermática pelo processo de migração ascendente (swim – up). Ao final deste período, foram coletados 850 μ L do sobrenadante e depositados em outro tubo cônico para promover a concentração dos espermatozóides mediante centrifugação durante 10 min. a 1.700 rpm. O pellet formado foi suspenso em meio Fert-TALP obtendo-se uma dose inseminante de 1×10^6 espermatozóides/mL. Após a inseminação (D0), os oócitos foram incubados com os espermatozóides por 20 horas, nas mesmas condições atmosféricas da maturação.

3.4.5 Cultivo *in vitro*

Após a fecundação, as estruturas foram transferidas para o meio de manipulação (TCMm – Hepes), no qual foi procedida a remoção das células do *Cumulus oophorus*, mediante pipetagem. As estruturas recuperadas foram transferidas para o meio de cultivo SOFm acrescido de 1,5 mM de glicose (G-6152) e 5% de SFB. As gotas de 80 µL, sob óleo mineral, foram mantidas a 38,3 °C em estufa de cultivo com atmosfera de 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂. Ao final de 48 horas (D2) de 120 horas (D7) de cultivo realizou-se a avaliação da clivagem e do desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto.

3.4.6 Análise estatística

As taxas de eclosão e produção de blastocisto foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado, utilizando-se a tabela de contingência com nível de significância de 0,5%.

3.5 RESULTADOS

Experimento 1: Efeito do co-cultivo de CCOs intactos com ODs durante a maturação *in vitro* em gotas de 50 µL.

A exposição dos COCs aos oócitos desnudos em gotas de 50 µL não alterou as taxas de clivagem e blastocistos quando comparadas aquelas obtidas pelo grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1: Efeito do co-cultivo de CCOs intactos com DOs durante a maturação *in vitro* em gotas de 50 μ L (três repetições, $P \leq 0,05$).

Grupo	Número de oócitos	Taxa de clivagem		Taxa de blastocisto (D7)	
		N	%	N	%
Controle 50 μ L	136	94	69,11	32	23,52
ODs	64	45	70,31	19	29,68

Experimento 2: Avaliação do efeito de dois procedimentos de adição dos ODs aos CCOs intactos durante a maturação *in vitro*.

Conforme pode-se verificar na Tabela 2, a taxa de clivagem dos diferentes métodos de adição de oócitos e os grupos controle não diferiu entre si, porém houve diferenças significativas entre as taxas de desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocistos. O Grupo 2 (no qual os oócitos desnudos foram transferidos para as gotas de maturação dos CCOs intactos) apresentou taxa de blastocisto significativamente ($P \leq 0,05$) maior (26,38%) que aquela obtida no grupo controle de 50 μ L (13,04%). Não houve diferença entre o restante dos grupos avaliados.

Tabela 2: Avaliação do efeito de dois procedimentos de adição dos ODs aos CCOs intactos com durante a maturação *in vitro* (6 repetições; a,b: $P \leq 0,05$).

Grupo	Oócitos	Taxa de clivagem		Taxa de blastocisto (D7)	
	N	N	%	N	%
Controle	89	61	68,53	13 ^{a,b}	14,60
100 μ L					
Controle	69	48	69,56	9 ^b	13,04
50 μ L					
1	71	47	66,19	13 ^{a,b}	18,30
2	72	49	68,05	19 ^a	26,38

Grupo 1: CCOs transferidos após 9 horas de MIV para as gotas com oócitos desnudos. Grupo 2: Oócitos desnudos transferidos após 9 horas de MIV para as gotas dos CCOs.

3.6 DISCUSSÃO

Nas últimas três décadas diferentes grupos de pesquisadores vem afirmando a existência da dependência dos oócitos às células da granulosa e do *cummulus* durante a maturação. Mais recentemente, uma série de evidências tem mostrado que fatores parácrinos secretados pelo oócito podem regular as funções das células do *cummulus* e da granulosa, incluindo sua proliferação, diferenciação, apoptose e expansão (Eppig, 2001; Hussein *et al.*, 2005). Hussein *et al.* (2006) mostraram que os FSOs aumentam a competência de desenvolvimento do oócito durante a MIV, tanto em sua forma nativa quanto através de fatores recombinantes exógenos como BMP-15 e GDF-9. No trabalho realizado por Gilchrist e Thompson (2007) na espécie bovina, os autores obtiveram um aumento de 20% das taxas de blastocisto, onde o controle apresentou uma taxa de blastocisto de 39% e o grupo acrescido de ODs após 9 horas de maturação apresentou uma taxa de 61%.

A capacidade de um oócito suportar a fecundação e o posterior desenvolvimento embrionário está diretamente relacionada com a competência de desenvolvimento do oócito adquirida durante a foliculogênese. A competência meiótica é adquirida durante a fase antral próxima a ovulação (Eppig, 2001). Durante esta última fase de desenvolvimento, o oócito mantém um contato íntimo com as CC mantendo-se relativamente isolado do restante do folículo. O CCO proporciona um microambiente altamente especializado e as CC são funcionalmente distintas das células da granulosa remanescentes no folículo, sendo as mesmas completamente dependentes da sinalização parácrina do oócito (Eppig *et al.*, 1997). Poderíamos mimetizar este microambiente *in vitro*? Haveria alguma substância a ser acrescida ao meio de MIV que proporcionasse esta sinalização parácrina para regulação das funções das CC? Segundo alguns autores (Hussein *et al.*, 2005; Gilchrist e Thompson, 2007; Yeo *et al.*, 2008; entre outros) a adição de oócitos desnudos ou fatores recombinantes exógenos seria capaz de promover esta sinalização desejada, proporcionando uma maturação oocitária (conceito de Hytell *et al.*, 1997) adequada e, conseqüentemente, melhores taxas de blastocisto e de implantação embrionária. Estes autores obtiveram resultados distintos aqueles apresentados normalmente na literatura científica, apresentando um aumento significativo na taxa e na qualidade de blastocistos obtidos a partir de oócitos maturados juntamente com os ODs ou fatores recombinantes exógenos (BMP-15 e GDF-9).

Para verificar a possibilidade de um ambiente de MIV acrescido de ODs proporcionar melhores taxas de clivagem e blastocistos realizamos o primeiro experimento deste trabalho. Os CCOs foram adicionados às gotas que já continham os ODs por nove horas. Conforme os dados apresentados anteriormente (Tabela 1), não houve diferença na taxa de clivagem e na taxa de blastocisto entre o grupo maturado em co-cultivo com os ODs e o grupo controle no experimento 1.

Em momento algum a literatura consultada (Eppig, 2001; Gilchrist e Thompson, 2007; Hussein *et al.*, 2005; Yeo *et al.*, 2008) que relata o co-cultivo de CCOs com ODs, menciona se os ODs são acrescidos às gotas onde os CCOs estavam presentes ou se os CCOs são adicionados às gotas onde

permaneciam os ODs após as 9 horas de maturação. A fim de esclarecer esta dúvida e verificar se há algum aumento nas taxas de clivagem e blastocistos, realizou-se o Experimento 2. Neste experimento os resultados apresentaram um aumento significativo na taxa de blastocisto do grupo 2, onde os ODs foram adicionados às gotas dos CCOs quando comparado ao grupo controle de 50 μ L (Tabela 2). Segundo Gilchrist *et al.* (2008) atualmente temos um conhecimento limitado de como os FSOs interagem com fatores maternos da foliculogênese bem caracterizados como FSH, LH, IGF-1, estradiol, andrógenos e activina – inibina, o que permite a especulação de que possa ter havido alguma interação entre os FSOs e o SFB presente no meio. Este fato poderia explicar as taxas obtidas no grupo 2, pois os CCOs poderiam ter metabolizado alguma molécula presente no meio, que interagisse com os FSOs, e posteriormente reagiriam à presença destes fatores no meio.

Segundo Eppig (2001) o principal objetivo da foliculogênese é a produção de um oócito competente, capaz de suportar a ativação e a embriogênese após a fecundação. Para atingir este objetivo os compartimentos germinativos e somáticos devem estar precisamente coordenados no folículo, sendo capazes de responder aos sinais endócrinos, parácrinos e autócrinos. Portanto, de acordo com Eppig (2001) a comunicação bidirecional entre oócito e células somáticas é essencial para o desenvolvimento e função de ambos os compartimentos foliculares. Segundo Buccione *et al.* (1990 a) as CG atuam proporcionando o suporte nutricional para o oócito. Estas ainda participam na manutenção do oócito em meiose, na supressão global da atividade transcricional e na indução das maturações nuclear e citoplasmática. Segundo Eppig (2001) as CC promovem o crescimento e desenvolvimento oocitários. A partir destas afirmações, outra explicação plausível para os resultados obtidos no experimento 2, seria que a secreção destes fatores poderia ser estimulada pela presença das CC, já que esta comunicação é extremamente complexa e bidirecional.

Apesar de não haver diferença estatística entre o restante dos grupos, há um aumento numérico no desenvolvimento de blastocistos dos grupos onde foram acrescentados os oócitos desnudos, mostrando haver alguma interação entre os FSOs e o posterior desenvolvimento embrionário. Podemos verificar

também um aumento numérico na taxa de blastocistos do grupo 2 (26,38%) em relação ao grupo 1 (18,30%). Estes dados indicam que se o número de repetições for maior, poder-se-ia detectar diferenças entre os grupos nas taxas de desenvolvimento embrionário.

A maior barreira para desenvolver e otimizar as técnicas de PIVE é a falta de conhecimento de como os oócitos adquirem competência ao desenvolvimento. Segundo Thomas e Vanderhyden (2006) há uma forte evidência de que as interações entre o oócito e as CGs sejam essenciais para um correto e coordenado desenvolvimento folicular. Acredita-se que os oócitos secretem uma grande e variada quantidade de fatores parácrinos que possuam capacidade de afetar as funções das CC. A identificação destes FSOs e seus mecanismos de ação são cruciais para o entendimento de como os oócitos controlam o desenvolvimento e funções das CG (Su *et al.*, 2009). Este entendimento poderá proporcionar o desenvolvimento de sistemas de MIV mais eficientes, permitindo a produção de embriões de melhor qualidade através da PIVE, e, conseqüentemente, o aumento das taxas de prenhez. Além disso, esta melhora na qualidade embrionária poderá solucionar um dos gargalos da PIVE, proporcionando a produção de indivíduos mais resistentes aos processos de crioconservação.

3.7 CONCLUSÃO

A adição de ODs aos CCOs parece aumentar a capacidade de desenvolvimento dos CCOs fecundados ao estágio de blastocisto *in vitro*.

3.8.REFERÊNCIAS

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.C.; e EPPIG, J.J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 543 – 547, 1990.

DRAGOVIC R.A.; RITTER L.J.; SCHULZ S.J.; AMATO F.; ARMSTRONG D.T.; GILCHRIST R.B. Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. **Endocrinology**, v. 146, p. 2798–2806, 2005.

EPPIG, J.J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.; HIRAO, Y. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 976 – 984, 1997.

EPPIG J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, p. 829–838, 2001.

GILCHRIST R.B.; RITTER L.J.; ARMSTRONG D.T. Oocyte–somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Anim Reprod Sci**; v. 82–83, p. 431–446, 2004.

GILCHRIST R.B.; RITTER L.J.;MYLLYMAA S.; KAIVO - OJA N.; DRAGOVIC R.A.; HICKEY T.E.; et al. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. **J Cell Sci**, v. 119, p. 3811–321, 2006.

GILCHRIST R.B.; THOMPSON J. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v. 67, p. 6-15, 2007.

GILCHRIST R.B.; LANE, M.; THOMPSON J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v.14, n.2, p. 159–177, 2008.

GILCHRIST R.B.; ALBUZ F.K.; THOMPSON J. A new approach to *in vitro* maturation (IVM) and embryo *in vitro* production: induced IVM substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **IETS**, Abstract, 2010.

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

HUSSEIN T.S.; FROILAND D.A.; AMATO F.; THOMPSON J.G., GILCHRIST R.B. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **J Cell Sci**, v. 118, p. 5257–5268, 2005.

HUSSEIN T.S.; THOMPSON J.G., GILCHRIST R.B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Dev Biol**, v. 296, p. 514–521, 2006.

LEIBFRIED, R. CRISTER, E. EYESTONE, W. NORTHEY, D. FIRST, N. Development potetial of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. **Biol Rep.** 36:376-383,1987.

LI R.; NORMAN R.J.; ARMSTRONG D.T.; GILCHRIST R.B. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. **Biol Reprod**, v. 63, p. 839–345, 2000.

PARRISH JJ, SUSKO-PARRISH JL, WIMER MA, FIRST NL. Capacitation of bovine sperm by heparine. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 1171-1180, 1988.

SU, Y.Q.; SUGIURA, K.; EPPIG, J. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. **Semin Reprod Med.**, v. 1, p. 34 – 42, 2009.

SUGIURA K.; EPPIG J.J.. Control of metabolic cooperativity between oocytes and their companion granulosa cells by mouse oocytes. **Reprod Fertil Dev**, v. 17, p. 667–674, 2005.

SUTTON M.L.; CETICA P.D.; BECONI M.T.; KIND K.L.; GILCHRIST R.B.; THOMPSON J.G. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. **Reproduction**, v. 126, p. 27–34, 2003

THOMAS, F.H.; VANDERHYDEN, B.C. Oocyte – granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p. 1 – 8, 2006.

VANDERHYDEN B.C.; TELFER E.E.; EPPIG J.J. Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles in vitro. **Biol Reprod**, v. 46, p. 1196–1204, 1992.

VANDERHYDEN B.C.; COHEN J.N.; MORLEY P. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis. **Endocrinology**, v. 133, p. 423–426, 1993.

YEO, C.X.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON J.G.; LANE, M. Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. **Human Reproduction**, v. 23, p. 67 – 73, 2008.

4. PERSPECTIVAS

Está se tornando evidente que o desenvolvimento e a diferenciação de componentes celulares, somáticos e germinativos dos folículos ovarianos mamíferos são intimamente associados e interdependentes. Segundo Gichrist *et al.* (2008), a comunicação entre oócito e células somáticas ganhou um novo significado na década passada. O conceito mais importante que surgiu foi que o oócito não era um componente passivo no folículo ovariano e sim que atuava como regulador fundamental na diferenciação das células somáticas e regulação central da foliculogênese.

Os novos experimentos estão mostrando que esta associação intercelular entre as células somáticas e germinativas prometem uma nova perspectiva no entendimento do desenvolvimento folicular. Muitas questões que ainda permanecem sem respostas poderão ser solucionadas. A sinalização oócito – CC através das junções gap e a sinalização parácrina bidirecional entre CC – oócito são exemplos de descobertas que necessitam mais estudos para serem completamente desvendados. Além disso, a interação destes processos com a sinalização maternal em um microambiente folicular dinâmico e a regulação da qualidade oocitária ainda permanecem desconhecidas.

Este entendimento poderá proporcionar o desenvolvimento de sistemas de MIV mais eficientes, permitindo a produção de embriões de maior qualidade através da PIVE, e, conseqüentemente, o aumento das taxas de prenhez. Além disso, esta melhora na qualidade embrionária poderá solucionar um dos gargalos da PIVE, proporcionando a produção de embriões mais resistentes aos processos de crioconservação, permitindo contornar alguns processos de infertilidade em mamíferos.

5. REFERÊNCIAS DISSERTAÇÃO

ALBERTINI, D.F.; COMBELLES, C.M.; BENECCHI, E.; CARABATSOS, M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 121, p. 647 – 653, 2001.

BAVISTER BD, ROSE-HELLEKANT TA, PINYOPUMMINTR T. Development of *In vitro* matured/*In vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. **Theriogenology**, v.37, p. 127-146, 1992.

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.C.; e EPPIG, J.J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 543 – 547, 1990 a.

BUCCIONE R.;VANDERHYDEN B.C.; CARON P.J.; EPPIG J.J. 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, p. 16–25, 1990 b.

BRACKETT B, BOUSQUET D., BOICE, M. DONARCICK., W. J. EVANS J. F. and DRESSELM A. Normal development following *In vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 27, p.147-158, 1982.

CANIPARI, R.; EPIFANO, O.; SIRACUSA, G.; SALUSTRI, A. Mouse oocytes inhibit plasminogen activator production by ovarian cumulus and granulosa cells. *Development of Biology*, v. 167, p. 371 – 378, 1995.

DE LA FUENTE, R.; EPPIG, J.J. Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. **Developmental Biology**, v. 229, p. 224 – 236, 2001.

DONG, J.; ALBERTINI, D.F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T.R.; LU, N.; MATZUK, M.M. Growth differentiation factor – 9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v. 383, p. 531 – 535, 1996.

DRAGOVIC R.A.; RITTER L.J.; SCHULZ S.J.; AMATO F.; ARMSTRONG D.T.; GILCHRIST R.B. Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. **Endocrinology**, v. 146, p. 2798–2806, 2005.

EL-FOULY, M.A.; COOK, B.; NEKOLA, M.;NALBANDOV, A.V. Role of the ovum in follicular luteinization. **Endocrinology**, v. 87, p. 286–293, 1970.

EPPIG, J.J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.; HIRAO, Y. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 976 – 984, 1997.

EPPIG J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, p. 829–838, 2001.

EPPIG, J.J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.L. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. **Proceedings National Academy of Sciences**. v. 99, p. 2890 – 2894, 2002.

FARIN, P.W.; FARIN, C.E. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. **Biology of Reproduction**, v.52, p. 676 – 682, 1995.

FUKUDA, Y.; ICHIKAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. Birth of normal calves resulting from bovine matured, fertilized and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. **Biology of reproduction**, v. 42, p. 114-119, 1990.

GALLOWAY, S.M.; MCNATTY, K.P.; CAMBRIGE, L.M.; LAITINEN, M.P.; JUENGEL, J.L.; JOKIRANTA, T.S.; MCLAREN, R.J.; LUIRO, K.; DODDS, K.G.;

MONTGOMERY, G.W. Mutations in an oocyte – derived growth factor gene (BMP – 15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage – sensitive manner. **Nature of Genetic**, v. 25, p. 279 – 283., 2000.

GEARHEART, W.W.; SMITH, C.; TEEPKER, G. Multiple ovulation and embryo manipulation in the improvement of beef cattle: relative theoretical rates of genetic change. **Journal of Animal Science**, V.67, p. 2863 – 2871, 1989.

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Mouse oocyte mitogenic activity is developmentally coordinated throughout folliculogenesis and meiotic maturation. **Developmental Biology**, v. 240, p. 289 – 298, 2001.

GILCHRIST R.B.; RITTER L.J.; ARMSTRONG D.T. Oocyte–somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Anim Reprod Sci**; v. 82–83, p. 431–446, 2004.

GILCHRIST R.B.; RITTER L.J.;MYLLYMAA S.; KAIVO - OJA N.; DRAGOVIC R.A.; HICKEY T.E.; et al. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. **J Cell Sci**, v. 119, p. 3811–321, 2006.

GILCHRIST R.B.; THOMPSON J. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, v. 67, p. 6-15, 2007.

GILCHRIST R.B.; LANE, M.; THOMPSON J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v.14, n.2, p. 159–177, 2008.

GILCHRIST R.B.; ALBUZ F.K.; THOMPSON J. A new approach to *in vitro* maturation (IVM) and embryo *in vitro* production: induced IVM substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **IETS**, Abstract, 2010.

GREVE T., CALLESEN H.; HYTTEL P. Follicular correlates with *in vitro* fertilization in cattle. **Journal Repro. Fertil. Suppl.**, v. 38, p. 117 – 126, 1989.

GREVE, T.; MADISON, V.; AVERY, B., CALLESEN, HYTTEL, P. In vitro production of bovine embryos: A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations. **Animal Reproduction Science**, v. 33, p. 51 – 69, 1993.

HANRAHAN, J.P.; GREGAN, S.M.; MULSANT, P.; MULLEN, M.; DAVIS, G.H.; POWELL, R.; GALLOWAY, S.M.; POWELL, R. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). **Biology and Reproduction**, v. 70, p. 900 – 909, 2004.

HAWAK H.W.; WALL R.J.; Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro* – produced oocytes. I: selection of oocytes and zygotes. **Theriogenology**. V 41, n.8, p. 1571 – 1583, 1994.

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

HUSSEIN T.S.; FROILAND D.A.; AMATO F.; THOMPSON J.G., GILCHRIST R.B. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **J Cell Sci**, v. 118, p. 5257–5268, 2005.

HUSSEIN T.S.; THOMPSON J.G., GILCHRIST R.B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Dev Biol**, v. 296, p. 514–521, 2006.

JUENGEL, J.L.; MCNATTY, K.P. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. **Human Reproduction Update**, v. 11, p.143 – 160, 2005.

JOYCE, I.M.; PENDOLA, F.L.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J.J.. Oocyte regulation of kit ligand expression in mouse ovarian follicles. **Development of Biology**, v. 214, p. 342 – 353, 1999.

LEIBFRIED, R. CRISTER, E. EYESTONE, W. NORTHEY, D. FIRST, N. Development potetial of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. **Biol Rep.** 36:376-383,1987.

LI R.; NORMAN R.J.; ARMSTRONG D.T.; GILCHRIST R.B. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. **Biol Reprod**, v. 63, p. 839–345, 2000.

MC NATTY, K.P.; JUENGEL, J.L.; READER, K.L.; LUN, S.; MYLLYMAA, S.; LAWRENCE, S.B.; WESTERN, A.; MEERASAHIB, M.F.; MOTTERSHEAD, D.G.; GROOMEN.P.*et al.* Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. **Reproduction**, v. 129, p. 481 – 487, 2005.

MCNATTY, K.P.; HUDSON, N.L.; WHITING, L.; READER, K.L.; LUN, S.; WESTERN, A.; HESTH, D.A.; SMITH, P.; MOORE, L.G.; JUENGEL, J.L. The effects of immunizing sheep with different BMP15 or GDF9 peptide sequences on ovarian follicular activity and ovulation rate. **Biology of Reproduction**, v. 76, p. 552 – 560, 2007.

MARQUANT-LEGUIENNE B AND HUMBOLT P. Practical measures to improve *In vitro* blastocyst production in the bovine. **Theriogenology**, v. 49, p.3-11, 1998.

MOOR RM, OSBORN JC. Somatic control of protein synthesis in mammalian oocytes during maturation. **Ciba foundation symposium**, v. 98:178-96. 1983

NEKOLA, M.V.; NALBANDOV, A.V. Morphological changes of rat follicular cells as influenced by oocytes. **Biolgy of Reproduction**,v. 4, p.154–160, 1971.

PARRISH JJ, SUSKO-PARRISH JL, WIMER MA, FIRST NL. Capacitation of bovine sperm by heparine. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 1171-1180, 1988.

PINCUS, G. e ENZMANN, E.V. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. The activation of ovarian eggs. **Journal of Experimental Medicine**, v. 62, p. 655 – 675, 1935.

RUSSELL, D.L.; ROBKER, R.L. Molecular mechanisms of ovulation: coordination through the cumulus complex. **Human Reproduction Update**, v. 13, p. 289 – 312, 2007.

SALUSTRI, A.; ULISSE, S.; YANAGISHITA, M.; HASCAL, V.C. Hyaluronic acid syntesis by mural granulose cells and cumulus cells in vitro is selectively stimulated by a factor produced by oocytes and by transforming growth factor-beta. **Journal of Biology Chemistry**, v. 265, p. 19517 – 19523, 1990 a.

SALUSTRI, A; YANAGISHITA, M.; HASCAL, V.C. Mouse oocytes regulate hyaluronic acid synthesis and mucification by FSH – stimulated cumulus cells. **Development of Biology**, v. 138, p. 26 – 32, 1990 b.

SCHMIDT, M.; GREVE, T.; AVERY, B.; SULON, J.; HANSEN, H.B. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 46, p. 527 – 539, 1996.

SHIMASAKI, S.; MOORE, R.K.; OTSUKA, F.;ERICKSON, G.F. S. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. **Endocrinology**, v. 25, p. 72 – 101, 2004.

SIMON, A.M.; GOODENOUGH, D.A.;LI, E.; PAUL, D.L. Female infertility in mice lacking connexin 37. **Nature**, v. 385, p. 525 – 529, 1997.

SINCLAIR, K.D.; MCEVOY T.G.; MAXFIELD, E.K.; MALTIN,C.A.; YOUNG, L.E.; WILMUT, I.; BRADBENT, P.J.; ROBINSON, J.J. Aberrant fetal growth and

development after in vitro culture of sheep zygotes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 116, p. 177 – 186, 1999.

SU, Y.Q.; SUGIURA, K.; EPPIG, J. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. **Semin Reprod Med.**, v. 1, p. 34 – 42, 2009.

SUGIURA K.; EPPIG J.J.. Control of metabolic cooperativity between oocytes and their companion granulosa cells by mouse oocytes. **Reprod Fertil Dev**, v. 17, p. 667–674, 2005.

SUTTON M.L.; CETICA P.D.; BECONI M.T.; KIND K.L.; GILCHRIST R.B.; THOMPSON J.G. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. **Reproduction**, v. 126, p. 27–34, 2003

SUTTON – MCDOWALL, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Effect of hexoses and gonadotrophin supplementation on bovine oocyte nuclear maturation during in vitro maturation in a syntethetic follicle fluid medium. **Reproduction and Fertility Development**, v. 17, p. 407 – 415, 2005.

TAKAGI, M.; CHOI, Y.H.; KAMISHITA, H.; ACOSTA, T.J.; WIJAYAGUNAWAEDANE, M.P.; MIYAMOTO, A.; MIYAZAWA, K.; SATO, K. Oocyte quality of small antral follicles coexisting with cystic follicles in the ovaries of the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 51, n. 3, p. 195 – 203, 1998.

THIBIER, M. New biotechnologies in cattle production in **7 th. Congress of the F.A.V.A.** 4 – 7 November. Pattaya (Thailande), p. 513-524. 1990.

THOMAS, F.H.; VANDERHYDEN, B.C. Oocyte – granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p. 1 – 8, 2006.

THOMPSON, J.G.; GARDNER, D.K., PUGH, P.A.; MCMILLAN, W.H.; TERVIT, H.R. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 53, 1385 – 1391, 1995.

THOMPSON J.G. The impact of nutrition of the cumulus oocyte complex and embryo on subsequent development in ruminants. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 1, p169 – 175, 2006.

THOMPSON J.G.; MITCHEL M.; KINO K. Embryo culture and long – term consequences. **Reprod. Fert. And Dev.**, v. 19, p. 43 – 52, 2007.

VANDERHYDEN B.C.; CARON, P.J.; BUCCIONE, R.; EPPIG, J.J. Developmental pattern the secretion of cummulus expansion – enabling factor by mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation. **Development of Biololgy**, v. 140, p. 307 – 317, 1990.

VANDERHYDEN B.C.; TELFER E.E.; EPPIG J.J. Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles in vitro. **Biol Reprod**, v. 46, p. 1196–1204, 1992.

VANDERHYDEN B.C.; COHEN J.N.; MORLEY P. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis. **Endocrinology**, v. 133, p. 423–426, 1993.

VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHÃO, M.P.; CAMARGO, S.A. Use of *in vitro* fertilization technique in the last decade and its effect on brazillizn embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 38 (Supl. 2), p. 661 – 674, 2010.

YANG, X. Cellular and molecular regulation of oocyte maturation, activation and fertilization in cattle. **XII Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, Anais**, v. 25, p. 84 – 92, 1997.

YEO, C.X.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON J.G.; LANE, M. Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. **Human Reproduction**, v. 23, p. 67 – 73, 2008.