



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 10
(FGF10), DURANTE A MATURAÇÃO OOCITÁRIA, NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES BOVINOS**

Patricia Kubo Fontes

Orientador: Prof. Dr. Ciro Moraes Barros
Co-Orientador: Dr. Rafael Augusto Satrapa

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biomédicas

BOTUCATU – SP

2011

Patrícia Kubo Fontes

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 10 (FGF10), DURANTE A MATURAÇÃO OOCITÁRIA, NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas

Orientador: Prof. Dr. Ciro Moraes Barros
Co-Orientador: Dr. Rafael Augusto Satrapa

BOTUCATU – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Fontes, Patricia Kubo.

Influência da adição de fator de crescimento fibroblástico 10 (FGF10), durante a maturação oocitária, na produção *in vitro* de embriões bovinos / Patricia Kubo Fontes. – Botucatu : [s.n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ciro Moraes Barros

Coorientador: Rafael Augusto Satrapa

Capes: 21001006

1. Bovino – Embrião. 2. Fertilização *in vitro*.

Palavras-chave: Bovino; Embrião; FGF10; Maturação; Produção *in vitro*.

Aos meus pais e irmãs.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais, Luis e Neide, e minhas irmãs, Daiane e Luisa, que durante todos os dias dessa nova etapa da minha vida me apoiaram e proporcionaram tudo que eu necessitava para alcançar meus objetivos.

Agradeço também ao Prof. Dr. Ciro Moraes Barros que permitiu que tudo fosse realizado. Exemplo de pessoa e profissional, possibilitou que eu desse meus primeiros passos na área da pesquisa.

Em seguida, mas não menos importante, agradeço ao Dr. Rafael Augusto Satrapa, mais que co-orientador, foi um grande amigo e professor. Sábio, me ensinou como superar qualquer problema e como aprender com meus erros.

Assim como deixo minha gratidão em especial aos amigos de laboratório que me auxiliaram na realização dos meus experimentos e sempre estiveram dispostos a me ajudar, Eduardo, Janahi e Rafaela. Além desses, é uma grande honra trabalhar com toda essa maravilhosa equipe do laboratório: Anthony, Antônio, Bárbara, José Renato, Isabele, Maurício, Raquel, Ronaldo e Vinícius. Obrigada por todo o conhecimento que me proporcionaram e pela alegria de todo dia ir trabalhar. Não podendo deixar de citar a grande importância do lab. Bura, que ajudou e compartilhou de muitos momentos do meu crescimento: Prof. Dr. José Buratini Júnior, Cíntia, Estér, Felipe, Mariana, Paula e Rúbia. E os funcionários do Departamento de Farmacologia: Cristina, Janete, Luis e Paulo.

Fora do ambiente acadêmico, agradeço minhas companheiras de casa: Bianca, Cíntia, Cristiane e Mariana, e meu grande amigo Alexandre.

Agradeço também a instituição FAPESP que concedeu uma bolsa de Iniciação Científica (PROCESSO: 2011/00848-4) e proporcionou financiamento essencial para realização dos experimentos.

Por fim agradeço à minha maior fonte de crescimento e conhecimento: Encontro Nacional de Biomedicina, na organização desse magnífico evento pude aprender muito e conhecer pessoas que levarei para toda minha vida: Amanda, Ana Carolina, André, Carla, Cristiane, Grazielle, Larissa, Luis, Marcos, Marina, Mayara, Melina, Rafael e Raphael, e em especial meus companheiros de turma: Bianca, Felipe, Iberê, Mariana, Vanessa e Vinícius.

RESUMO

A pecuária brasileira destaca-se mundialmente por possuir o maior rebanho comercial de gado e liderar a exportação de carne e a produção de embriões bovinos. A técnica de produção *in vitro* (PIV) de embriões é considerada boa alternativa para superar problemas como infertilidade de vacas com alto valor econômico e para melhoramento genético de rebanhos. A maturação oocitária *in vitro* é etapa determinante para o sucesso da PIV, porém insatisfatória quando comparada à maturação *in vivo*. Estudos recentes demonstraram a participação do Fator de Crescimento Fibroblástico 10 (FGF10) durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, onde favoreceu a expressão de genes relacionados a maturação oocitária e expansão das células do *cumulus*. Cientes de que a fase de maturação influencia a produção final de blastocistos, objetivamos com o presente estudo analisar se a adição do FGF10 no meio de maturação é capaz de interferir positivamente na PIV de embriões bovinos. Para tal, o FGF10 foi adicionado à maturação em 5 diferentes concentrações: 0,5 ng/mL (grupo 0,5), 2,5 ng/mL (grupo 2,5), 5 ng/mL (grupo 5), 10 ng/mL (grupo 10) e 50 ng/mL (grupo 50). Adicionalmente, dois outros grupos de maturação foram utilizados, grupo BSA (Albumina Sérica Bovina, 4 mg/mL) e o grupo SFB (Soro Fetal Bovino, 10%). As taxas de clivagem, mórula e blastocisto foram analisadas por Análise de Variância (ANOVA), sendo consideradas significantes as diferenças com $P < 0,05$. A taxa de clivagem não diferiu entre os sete grupos experimentais. Por outro lado, a taxa de mórula do grupo SFB foi superior quando comparado aos grupos BSA, 0,5, 10 e 50 ($P < 0,05$), porém não diferiu dos grupos tratados com dose intermediária de FGF10 (2,5 e 5). Efeito superior do grupo SFB também foi observado na taxa de blastocisto, visto que a taxa de produção de blastocisto dos demais seis grupos foram muito aquém do grupo SFB ($P < 0,0001$). Portanto, a utilização de FGF10, durante a maturação oocitária, na produção *in vitro* de embriões bovinos, não interferiu positivamente na PIV de embriões bovinos.

Palavras-chave: bovino, embrião, FGF10, maturação, produção *in vitro*.

ABSTRACT

The Brazilian livestock stands out for having the world largest commercial herd of cattle and leads meat exportation and production of bovine embryos. The *in vitro* production (IVP) of embryos is considered an effective option to overcome problems such as infertility in cows with high economic value and also for genetic improvement of cattle. The *in vitro* oocyte maturation is an essential step to the success of IVP, but is still considered poor when compared to *in vivo* maturation. Recent studies have suggested an important role of Fibroblast Growth Factor 10 (FGF10) on the *in vitro* maturation of oocytes, which favored the expression of genes related to oocyte maturation and *cumulus* cell expansion. Aware that maturity stage influences the final production of blastocysts, we aimed study to verify if the addition of FGF10 into the maturation medium is able to affect positively the IVP of bovine embryos. Hence, FGF10 was added to maturation in five different concentrations: 0.5 ng/mL (group 0.5), 2.5 ng/mL (group 2.5), 5 ng/mL (group 5), 10 ng/mL (group 10) and 50 ng/mL (group 50). Additionally, two other maturation groups were used, group BSA (Bovine Serum Albumin, 4 mg/mL) and group FCS (Fetal Calf Serum, 10%). The rates of cleavage, morula and blastocyst were analyzed by Analysis of Variance (ANOVA), differences of $P < 0.05$ were considered significant. Cleavage rates did not differ between the seven groups. On the other hand, morula rate on FCS group was higher than groups BSA, 0.5, 10 and 50 ($P < 0.05$), but did not differ among groups treated with intermediate doses of FGF10 (2.5 and 5). FCS group presented higher blastocyst rate compared to all other groups that were well below the FCS group ($P < 0.0001$). Therefore, the use of FGF10 during oocyte maturation did not affect positively embryo development on the IVP of bovine embryos.

Keywords: bovine, embryo, FGF10, maturation, *in vitro* production.

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Introdução e Revisão de Literatura.....	7
Justificativa e Objetivos.....	9
Materiais e Métodos.....	9
Análise Estatística.....	11
Resultados.....	11
Discussão.....	13
Referências.....	15

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O agronegócio brasileiro destaca-se por contribuir com 25,1% do produto interno bruto (PIB) do país (Cepea, 2007). A pecuária bovina insere-se neste contexto por possuir o maior rebanho comercial do mundo com mais de 207 milhões de cabeças (Brasil, 2005) consagrando o Brasil como maior exportador de carne dessa espécie. Dentre as raças de corte, a Nelore (*Bos indicus*) é a que apresenta o maior contingente numérico possuindo mais de 90 milhões de cabeças (Acnb, 2006).

Atualmente o Brasil lidera o mercado mundial de produção de embriões bovinos, somadas as produções *in vivo* e *in vitro* (PIV). Do total da produção mundial de embriões bovinos, produzidos mediante ambas as técnicas descritas acima, 25% são originados no Brasil (Viana, 2005).

A PIV vem sendo aplicada para o aumento na produção do número de embriões destinados à transferência comercial. A técnica é capaz de superar problemas como os de infertilidades adquiridas de vacas com alto valor econômico (Galli *et al.*, 2003) e proporcionar aumento de ganho genético através da multiplicação de bovinos com grande potencial genômico (Vishwanath, 2003).

Um dos fatores que pode interferir na fertilização do oócito e, conseqüentemente, na taxa final de blastocistos resultante da PIV é a maturação *in vitro*. Apesar do grande avanço na produção de embriões bovinos, os resultados de maturação oocitária em condições de cultivo são insatisfatórios, quando comparados à maturação *in vivo*. Vale ressaltar que a maturação oocitária é uma das etapas determinante para o sucesso da técnica e resultados insatisfatórios nesta fase alteram drasticamente a taxa final de embriões produzidos (Eppig, 2001; Gilchrist *et al.*, 2004; McNatty *et al.*, 2004). Portanto, conhecer melhor os mecanismos que controlam a maturação oocitária e os fatores que são liberados em resposta às gonadotrofinas durante esta etapa é fundamental para melhorar os resultados da técnica de PIV de embriões.

Dentre os fatores que influenciam na maturação oocitária daremos destaque aos fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs), principalmente ao FGF10. A família dos FGFs é composta de 22 peptídeos, sendo dividida em 7 subfamílias (Sleeman *et al.*, 2001). Dois destes fatores de crescimento são expressos pelo oócito bovino, os FGF10 (Buratini *et al.*, 2007) e FGF17 (Machado *et*

al., 2009) que possivelmente estão envolvidos na regulação da diferenciação das células do *cumulus*, já que elas expressam receptores para esses FGFs.

O FGF10 foi originalmente isolado do mesênquima pulmonar de ratos. Esse fator também conhecido como KGF-II (fator de crescimento dos queratinócitos II), pertence à subfamília do FGF7 (FGF3, FGF7, FGF10 e FGF22), cujos membros interagem principalmente com os receptores: FGFR2b e FGFR1b (Igarashi *et al.*, 1998; Itoh & Ornitz, 2004; Zhang *et al.*, 2006). Ao fator, foi atribuída a função de potente agente quimiotático nas porções distais do pulmão, o que permite a ação direcionadora do crescimento celular e tecidual (Min *et al.*, 1998; Sekine *et al.*, 1999).

A expressão do FGF10 foi detectada em oócitos e células da teca de folículos antrais bovinos. Apesar da similaridade estrutural entre o FGF7 e o FGF10, seus padrões de expressão diferem no folículo, visto que FGF7 não é expresso em oócitos. Em folículos saudáveis estrogênicos, a expressão do FGF10 mostrou-se diminuída e o tratamento com FGF10 inibiu a produção de estradiol de células da granulosa, o que, em conjunto, sugere que a supressão do FGF10 resultaria na continuidade do desenvolvimento folicular (Buratini *et al.*, 2007). Em adição, a expressão do FGF10 mostrou-se muito fraca em folículos atrésicos, fato que enfatiza seu envolvimento no controle da regressão folicular (Buratini *et al.*, 2007).

Apesar dos resultados já obtidos no ambiente folicular, receptores de FGF10 foram detectados nas células da granulosa murais (Berisha *et al.*, 2004) e do *cumulus* (Cho *et al.*, 2008) o que reforça a hipótese de que o FGF10 participa da sinalização parácrina oriunda do oócito e das células da teca com alvo nas células da granulosa murais e do *cumulus*.

Experimentos recentes mostram que o FGF10 é altamente expresso em oócitos bovinos, maturados *in vitro* e *in vivo* (dados ainda não publicados). A manutenção da expressão do FGF10 após a maturação oocitária e o encontro de valores máximos de expressão em oócitos maturados *in vivo* sugerem a participação do FGF10 na interação *cumulus*-oócito durante a maturação oocitária (dados ainda não publicados).

Dados complementares do mesmo grupo de pesquisa (dados ainda não publicados) demonstraram grande melhora visual na expansão das células do *cumulus* por adição de FGF10 ao meio de maturação, além disso, o FGF10 aumentou a expressão dos principais genes relacionados à expansão (AREG,

EREG, PTX3 e TNFAIP6). A betacelulina, ao contrário da AREG e EREG, é inibida pela ação do FSH e portanto encontra-se expressa em baixa quantidade em oócitos maduros. Na presença do FGF10 a betacelulina teve sua expressão diminuída enquanto os genes ativos na presença de FSH, AREG e EREG, foram super estimulados.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

A adição de novos fatores aos meios utilizados na produção *in vitro* com o intuito de otimizar o processo, faz-se necessária para o aprimoramento da técnica. Dessa forma, tendo em vista os efeitos positivos do FGF10 na maturação oocitária, o experimento proposto visou analisar se a adição deste fator durante a maturação é capaz de interferir positivamente na PIV, de forma dose-dependente, por meio da verificação da taxa de blastocistos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos

Recuperação e classificação dos oócitos

As aspirações foliculares foram realizadas em ovários de vacas aneloradas provenientes de abatedouro em dias aleatórios do ciclo estral. Os folículos com diâmetro entre 3 a 8 mm foram puncionados e os COCs (complexos *cumulus*-oócitos) imaturos depositados em tubos cônicos estéreis (Corning) e imersos em banho-maria à 37°C. Após a sedimentação, os COCs foram classificados de acordo com as suas características celulares em quatro categorias. Foram selecionados apenas os COCs com citoplasma homogêneo, circundados por três ou mais camadas compactas de células do *cumulus*, estes divididos aleatoriamente nos 7 grupos experimentais descritos a seguir.

Maturação *in vitro* e grupos experimentais.

Os oócitos selecionados foram depositados em gotas contendo 90 µL de meio de maturação e cobertas com óleo mineral em placas de Petri. As placas permaneceram em estufas a 5% de CO₂ pelo período de 22 horas.

O meio de maturação utilizado para o grupo controle do laboratório (Grupo SFB) foi o TCM 199 com bicarbonato, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de piruvato (solução 100 mM), 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de amicacina, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FSH e 2 UI/mL de LH. Os meios de maturação correspondentes aos demais grupos experimentais não tiveram a presença de SFB e foram acrescidos de 4 mg/mL BSA (Albumina Sérica Bovina). Adicionalmente ao BSA, concentrações crescentes de FGF10 (R&D systems, Recombinant Human FGF10, 345-FG) foram adicionadas: 0 ng/mL (Grupo BSA), 0,5 ng/mL (Grupo 0,5), 2,5 ng/mL (Grupo 2,5), 5 ng/mL (Grupo 5), 10 ng/mL (Grupo 10) e 50 ng/mL (Grupo 50).

Preparo do Sêmen e Fertilização *in vitro*

Os oócitos maturados foram transferidos para gotas contendo meio de fertilização composto de TL Stock acrescido de BSA livre de ácidos graxos (6 mg/mL), 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de piruvato (solução 100 mM), gentamicina (75 $\mu\text{g}/\text{mL}$), heparina (11 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e solução de PHE (44 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

Para fertilização, foram utilizadas sêmen de touros Nelore. O descongelamento do sêmen foi realizado em água à 36°C por 30 segundos, com posterior avaliação de sua viabilidade. Os espermatozoides foram selecionados através de centrifugação em meio percol e posteriormente submetidos à avaliação de motilidade e concentração. Dessa forma foi calculado o volume necessário de sêmem que deveria ser adicionado à gota.

Desnudamento e Cultivo *in vitro* dos embriões

De 10 a 12 horas após a fertilização (hpi), os prováveis zigotos foram submetidos à turbilhamento na própria gota de fertilização por pipetagem até terem as células do *cumulus* circundantes removidas. Posteriormente foram transferidos para gotas de meio de cultivo em placas de Petri, onde permaneceram até o estágio de blastocisto

O meio de cultivo utilizado para o controle foi o SOFaaci (synthetic oviduct fluid; Holm, 1999) acrescido de SFB (5%; Gibco) e 13 mM de piruvato de sódio, para o grupo controle do laboratório. Para os demais grupos experimentais foi excluído do meio o SFB. Durante todo o cultivo, as placas contendo os embriões ficaram em atmosfera controlada de 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂.

As trocas parciais do meio de cultivo foram realizadas 72 e 120 hpi. Nestas trocas parciais, foram retirados 50 µL de meio já presente e acrescentados 50 µL de meio de cultivo fresco em cada gota (“feeding”).

Considerando o dia da fertilização como dia zero, no dia 3 de cultivo foi observado a quantidade de embriões que clivaram e no dia 5 foi observado a quantidade de embriões que chegaram ao estágio de mórula. No dia 8 de cultivo embrionário foi analisada a quantidade de blastocistos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As taxas de clivagem, mórula e blastocisto foram analisadas por Análise de Variância (ANOVA), utilizando o PROC GLM do programa SAS (SAS for Windows, version 9.2, Cary, NC). Os dados de porcentagem de clivagem, mórula e blastocisto foram transformados em arcoseno antes das análises. O modelo matemático inclui os diferentes tratamentos, considerando efeito de réplica como aleatório. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

No presente experimento foram utilizados 1117 oócitos de vacas aneloradas oriundos de matadouro para análise da taxa de blastocisto, sendo que destes, somente 586 foram utilizados para a análise das taxas de clivagem e mórula.

As taxas (LSMEAN – média dos quadrados mínimos \pm EPM – erro padrão da média) de clivagem, mórula e blastocisto dos grupos BSA (4 mg/mL BSA), 0,5 (4 mg/mL BSA + 0,5 ng/mL FGF10), 2,5 (4 mg/mL BSA + 2,5 ng/mL FGF10), 5 (4 mg/mL BSA + 5 ng/mL FGF10), 10 (4 mg/mL BSA + 10 ng/mL FGF10), 50 (4 mg/mL BSA + 50 ng/mL FGF10) e SFB (5 % de SFB) estão sumariadas nas tabelas 1 e 2 e na figura 1.

Não houve diferença nas taxas de clivagem entre os grupos experimentais (tabela e figura 1).

Ao analisar a produção embrionária no quinto dia de cultivo, verificou-se que a taxa de mórula do Grupo SFB foi superior ($P < 0,05$) às dos grupos BSA, 0,5, 10, 50. Entretanto, não houve diferença ($P > 0,05$) quando comparada as taxas de mórulas dos grupos SFB, 2,5 e 5. Além disso, comparando-se as taxas de mórula

dos grupos BSA e tratados com FGF10, bem como entre os tratados com FGF10, não observou-se diferença significativa (tabela 1 e figura 1).

Tabela 1 – Taxas de clivagem e mórula (LSMEAN \pm EPM), dos sete grupos experimentais, calculadas em relação ao número total de oócitos maturados (n=5 réplicas)

GRUPOS EXPERIMENTAIS	NÚMERO TOTAL DE OÓCITOS	TAXA DE CLIVAGEM	TAXA DE MÓRULA
BSA	97	70,36 \pm 3,72	20,63 \pm 5,54 ^a
0,5	93	69,60 \pm 3,72	26,85 \pm 5,54 ^a
2,5	57	71,94 \pm 4,99	30,05 \pm 7,44 ^{a,b}
5	54	65,58 \pm 4,99	25,96 \pm 7,44 ^{a,b}
10	94	71,29 \pm 3,72	23,23 \pm 5,54 ^a
50	95	60,93 \pm 3,72	19,40 \pm 5,54 ^a
SFB	96	76,44 \pm 3,72	44,00 \pm 5,54 ^b

Letras diferentes indicam diferença entre os grupos (P<0,05)

No presente experimento, a produção de blastocisto do Grupo SFB foi superior, quando comparada aos demais grupos experimentais (P<0,0001; tabela 2 e figura 1).

Tabela 2 – Taxa de blastocisto (LSMEAN \pm EPM), dos sete grupos experimentais, calculados em relação ao número total de oócitos maturados (n=9 réplicas)

GRUPOS EXPERIMENTAIS	NÚMERO TOTAL DE OÓCITOS	TAXA DE BLASTOCISTO
BSA	170	13,34 \pm 3,29 ^a
0,5	173	17,43 \pm 3,29 ^a
2,5	135	17,75 \pm 3,81 ^a
5	134	12,38 \pm 3,81 ^a
10	165	10,76 \pm 3,29 ^a
50	169	13,71 \pm 3,29 ^a
SFB	171	34,83 \pm 3,29 ^b

Letras diferentes indicam diferença entre os grupos (P<0,0001)

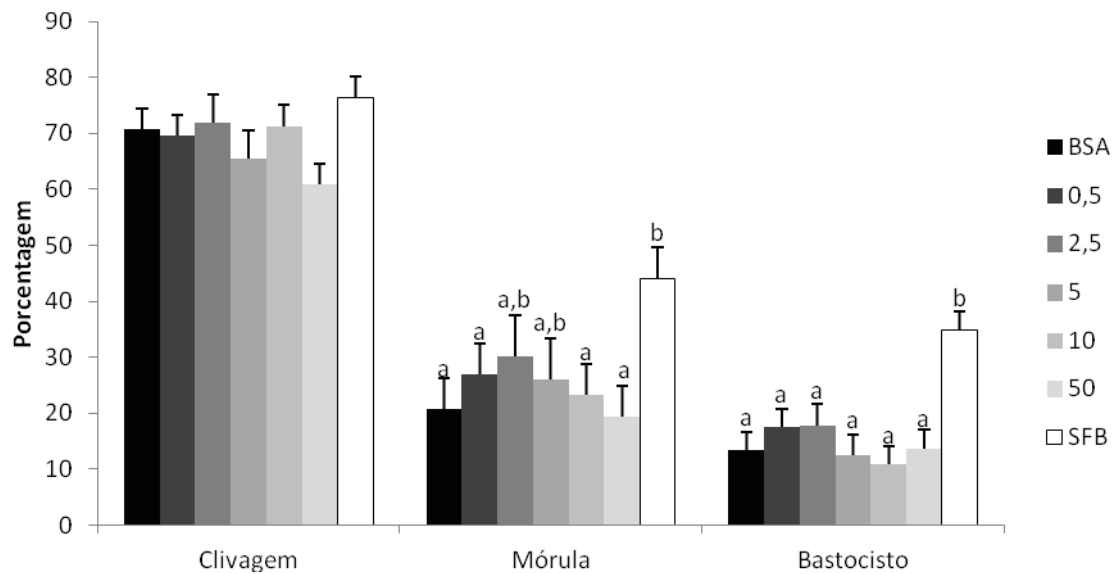


Figura 1 - Taxas de clivagem, mórula e blastocisto dos sete grupos experimentais. Letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$)

DISCUSSÃO

No presente experimento, a adição de FGF10 durante a maturação oocitária não aumentou as taxas de produção *in vitro* de embriões, sugerindo que o FGF10, nas concentrações testadas, não foi eficiente em suprir a ausência do SFB na PIV de embriões bovinos.

Os resultados do presente estudo, onde as taxas de clivagem não diferiram entre os sete grupos experimentais, corroboram os de Zhang *et al.* (2010), os quais demonstraram não haver diferença significativa quando comparados os grupos tratados com FGF10, nesta fase de desenvolvimento. Adicionalmente, Cho *et al.* (2002) observaram que as taxas de clivagem de embriões bovinos produzidos *in vitro*, suplementados ou não com SFB, não diferiram, sugerindo que, nos estágios iniciais de desenvolvimento, a suplementação protéica parece não influenciar na taxa de clivagem (Saeki *et al.*, 1995).

A ausência do efeito de tratamento nos estágios iniciais de desenvolvimento embrionário (72 hpi) pode estar relacionada à influência do RNA (ácido ribonucléico) materno nesse período. A ativação do genoma embrionário bovino ocorre no estágio de 8-16 células (isto é, após 72 hpi, Betteridge & Flechon, 1988), momento em que o embrião adquire independência da influência materna e

assume o controle do seu desenvolvimento. Desta forma, é provável que a influência do tratamento se manifeste majoritariamente nos estágios seguintes de desenvolvimento.

A porcentagem de formação de mórulas do grupo SFB, observada no quinto dia de cultivo, foi superior à dos grupos BSA, 0,5, 10, e 50. Entretanto, quando os grupos SFB e os tratados com doses intermediárias de FGF10 (2,5 e 5 ng/mL) foram comparados, não observou-se diferença na taxa de produção de mórulas.

O efeito negativo na PIV oriundo dos grupos tratados com elevadas concentrações de FGF10 (grupos 10 e 50) pode estar relacionado a inibição da secreção de estradiol pelas células da granulosa. Buratini *et al.* (2007) demonstraram que a adição de FGF10 no cultivo de células da granulosa, em doses crescentes, inibiu significativamente a secreção de estradiol de forma dose-dependente. Levando-se em conta que o estradiol participa ativamente na maturação folicular e oocitária, estimulando a estereidogenese, o desenvolvimento e crescimento folicular (Beg & Ginther, 2006), baixas concentrações deste hormônio podem prejudicar a maturação oocitária.

A taxa de blastocisto do grupo SFB foi superior quando comparado aos grupos tratados com BSA e FGF10, ou seja, não suplementados com SFB. Tais resultados corroboram os de Cho *et al.* (2002) que verificaram um aumento significativo na taxa de blastocistos nos grupos suplementados com SFB no cultivo embrionário, quando comparado aos cultivados sem SFB. Efeito positivo do SFB também foi observado por Rizos *et al.* (2003) que verificaram maior transcrição de genes indicativos de qualidade embrionária (MnSOD, SOX, Bax, LIF e LR- β) nos grupos cultivados na presença do SFB em comparação aos grupos cultivados sem SFB.

Entretanto, os resultados do presente trabalho discordam daqueles descritos por Zhang *et al.* (2010), os quais demonstraram que o grupo suplementado com 0,5 ng/mL de FGF10 no meio de maturação apresentou melhores taxas de produção de embriões, comparado ao grupo sem FGF10. A discrepância observada entre estes resultados pode ser explicada, entre outros fatores, pelos diferentes métodos de cultivo *in vitro* empregados em cada laboratório. Zhang *et al.* (2010) utilizam PVA (álcool polivinil) como fonte protéica no meio de cultivo, diferente do que é empregado em nosso laboratório, no qual o meio de cultivo é suplementado

com BSA. Além disso, em seus experimentos, Zhang *et al.* (2010) utilizaram oócitos de vacas de raças européias (*Bos taurus*), enquanto que os utilizados no presente estudo foram oriundos de vacas predominantemente Nelore (*Bos indicus*). Satrapa *et al.* (2011), observaram diferenças nas taxas de produção de blastocisto da raça Nelore (*Bos indicus*, 34,7%) quando comparada a raça Holandês Preto e Branco (*Bos taurus*, 9,7%), confirmando a influência da raça na PIV.

Dados recentes ainda não publicados mostraram que a adição de 10 ng/mL de FGF10 aumentou a porcentagem de COCs que atingiram sua expansão máxima. Entretanto, mesmo com o efeito positivo na expansão do *cumulus*, o FGF10 não foi eficaz em aumentar a taxa de produção de embriões, demonstrando não haver correlação direta entre expansão das células dos COCs, maturação oocitária e taxa de produção de embriões (Luciano *et al.*, 1999). Além disso, Ali & Sirard (2002) verificaram maior produção de blastocistos em oócitos sem expansão do *cumulus*, quando comparados à oócitos expandidos.

Conclui-se que a adição de FGF10 no meio de maturação de embriões produzidos *in vitro* não melhora a produção embrionária quando comparada ao grupo BSA, e diminui as taxas de formação de blastocisto, quando comparada ao grupo tratado com SFB.

REFERENCIAS

- ACNB. Associação dos criadores de Nelore do Brasil. 2006. Disponível em: < <http://www.nelore.org.br> >. Acesso em: 13/07/2010.
- 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, p. 901-5, 2002.
- BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. Reproduction, v. 132, n. 3, p. 365-77, 2006.
- BERISHA, B.; SINOWATZ, F.; SCHAMS, D. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. Mol Reprod Dev, v. 67, n. 2, p. 162-71, 2004.
- BETTERIDGE, K. J.; FLECHON, J. E. The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. Theriogenology, v. 29, p. 155-187, 1988.
- BRASIL. Estatísticas da Pecuária. 2005. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br> >. Acesso em: 13/07/2010.

BURATINI, J.; PINTO, M. G. L.; CASTILHO, A. C.; AMORIM, R. L.; GIOMETTI I. C.; CAO, M.; NICOLA, E. S.; PRICE, C. A. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. *Biol Reprod*, v. 77, n. 4, p. 743-50, 2007.

CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. 2007. Disponível em: < <http://www.cepea.esalq.usp.br> >. Acesso em: 13/07/2010.

CHO, J. H.; ITOH, T.; SENDAI, Y.; HOSHI, H. Fibroblast growth factor 7 stimulates in vitro growth of oocytes originating from bovine early antral follicles. *Mol Reprod Dev*, v. 75, n. 12, p. 1736-43, 2008.

CHO, S. R.; CHO, S. K.; LEE, S. L.; LEE, H. J.; CHOE, S. Y.; RHO, G. J. Enhanced cryosurvival of bovine blastocysts produced in vitro in serum-free medium. *J Assist Reprod Genet*, v. 19, n. 10, p. 487-92, 2002.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v. 122, n. 6, p. 829-38, 2001.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, v. 59, n. 2, p. 599-616, 2003.

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. 431-46, 2004.

IGARASHI, M.; FINCH, P. W.; AARONSON, S. A. Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF)-10 reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). *J Biol Chem*, v. 273, n. 21, p. 13230-5, 1998.

ITOH, N.; ORNITZ, D. M. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet*, v. 20, n. 11, p. 563-9, 2004.

LUCIANO, A. M.; POCAR, P.; MILANESI, E.; MODINA, S.; RIEGER, D.; LAURIA.; GANDOLFI, F. Effect of different levels of intracellular cAMP on the in vitro maturation of cattle oocytes and their subsequent development following in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev*, v. 54, n. 1, p. 86-91, 1999.

MACHADO, M. F.; PORTELA, V. M.; PRICE, C. A.; COSTA, I. B.; RIPAMONTE, P.; AMORIM, R. L.; BURATINI JR, J. Regulation and action of fibroblast growth factor 17 in bovine follicles. *J Endocrinol*, v. 202, n. 3, p. 347-53, 2009.

MCNATTY, K. P.; MOORE, L. G.; HUDSON, N. L.; QUIRKE, L. D.; LAWRENCE, S. B.; READER, K.; HANRAHAN, J. P.; SMITH, P.; GROOME, N. P.; LAITINEN, M.; RITVOS, O.; JUENGEL, J. L. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. *Reproduction*, v. 128, n. 4, p. 379-86, 2004.

MIN, H.; DANILENKO, D. M.; SCULLY, S. A.; BOLON, B.; RING, B. D.; TARPLEY, J. E.; DEROSE, M.; SIMONETT, W. S. Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila* branchless. *Genes Dev*, v. 12, n. 20, p. 3156-61, 1998.

RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; PÉREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod*, v. 68, n. 1, p. 236-43, 2003.

SAEKI, K. et al. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on in vitro fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium. *Theriogenology*, v. 43, n. 4, p. 751-9, 1995.

SATRAPA, R. A.; NABHAN, T.; SILVA, C. F.; SIMÕES, R. A. L.; RAZZA, E. M.; PUELKER, R. Z.; TRINCAB, L. A.; BARROS, C. M. Influence of sire breed (*Bos indicus* versus *Bos taurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, v. 76, n. 6, p. 1162-7, 2011.

SEKINE, K.; OHUCHI, H.; FUJIWARA, M.; YAMASAKI, M.; YOSHIZAWA, T.; SATO, T.; YAGISHITA, N.; MATSUI, D.; KOGA, Y.; ITOH, N.; KATO, S. Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet*, v. 21, n. 1, p. 138-41, 1999.

SLEEMAN, M.; Fraser J.; McDonald M.; Yuan S.; White D.; Grandison P.; Kumble K.; Watson J. D.; Murison J. G. Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. *Gene*, v. 271, n. 2, p. 171-82, 2001.

VIANA, J. H. M. A produção mundial de embriões em 2004. *O Embrião - Um Jornal da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, v. 25, p. 4-5, 2005.

VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, v. 59, n. 2, p. 571-84, 2003.

ZHANG, K.; HANSEN, P. J.; EALY, A. D. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. *Reproduction*, v. 140, n. 6, p. 815-26, 2010.

ZHANG, X.; IBRAHIMI, O. A.; OLSEN, S. K.; UMEMORI, H.; MOHAMMADI, M.; ORNITZ, D. M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem*, v. 281, n. 23, p. 15694-700, 2006.