

**CARLA DECANINE**

**SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE MATURAÇÃO COM  
GONADOTROFINAS PLACENTÁRIAS NA PRODUÇÃO *IN*  
*VITRO* DE BLASTOCISTOS BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação do Instituto de  
Biotecnologia de Botucatu, Universidade  
Estadual Paulista – UNESP, para a  
obtenção do título de Mestre em Ciências  
Biológicas, Área Farmacologia

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira**

**Botucatu – SP**

**2013**

CARLA DECANINE

SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE MATURAÇÃO COM  
GONADOTROFINAS PLACENTÁRIAS NA PRODUÇÃO *IN*  
*VITRO* DE BLASTOCISTOS BOVINOS

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação do Instituto de Biociências de  
Botucatu, Universidade Estadual Paulista –  
UNESP, para a obtenção do título de Mestre  
em Ciências Biológicas, Área Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira

Botucatu – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSANGELA APARECIDA LOBO**

Decanine, Carla.

Suplementação do meio de maturação com gonadotrofinas placentárias na produção *in vitro* de blastocistos bovinos / Carla Decanine. – Botucatu : [s.n., 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Marcelo Fábio Gouveia Nogueira

Capes: 50501038

1. Fertilização *in vitro*. 2. Bovino - Embrião. 3. Gonadotrofinas. 4. Blastocistos.

Palavras-chave: eCG; Gonadotrofinas; hCG; Maturação *in vitro*; Oócitos bovinos.

*Dedicatória*

A minha família, pelo apoio e amor incondicional, pelo esforço e compreensão dedicados que me fizeram ser a Pessoa que sou hoje. Serei eternamente grata.

*Agradecimentos*

Agradeço primeiramente a Deus e aos meus Anjos da Guarda por terem me escutado e iluminado meus pensamentos nas horas que mais precisei, além de me protegerem e regerem durante os momentos difíceis;

Ao meu orientador, Professor Marcelo Fábio Gouveia Nogueira, por ter me aceitado como orientada e ter confiado em mim, sendo atencioso e paciente, acreditando que eu pudesse enfrentar esta etapa tão importante da minha vida;

À Isabele Picada Emanuelli, por ter sido amiga e companheira de casa, além de uma professora paciente e grande incentivadora. Obrigada por todos os conselhos que levarei para sempre comigo;

Aos meus pais, Roberto e Márcia, e minhas irmãs, Juliana e Roberta, por estarem sempre ao meu lado me apoiando, investindo em meus estudos e me dando forças para seguir em frente. Amo muito vocês!

Ao meu namorado, Roger, pela paciência, companheirismo e carinho. Obrigado pelo apoio incondicional, amo você!

À toda equipe do Laboratório de Micromanipulação Embrionária (LaME) que direta ou indiretamente colaboraram para este trabalho. Aos amigos da Pós-Graduação Mariana F. Machado, Eduardo M. Razza e Antônio G. R. Pupulim pela ajuda em minhas idas a Botucatu e pela amizade durante estes dois anos;

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo suporte financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho;

MUITO OBRIGADA!

*Epígrafe*



*Você nunca sabe que resultados virão da  
sua ação. Mas se você não fizer nada,  
não existirão resultados.*

*Mahatma Gandhi*



## SUMÁRIO

### Lista de Abreviaturas

### Lista de Tabelas

<b>Capítulo 1</b> .....	<b>15</b>
Resumo e Abstract.....	17
Introdução .....	21
Hipótese e Objetivos .....	25
Revisão de Literatura .....	27
Referências Bibliográficas.....	36
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>49</b>
Resumo.....	51
Contexto.....	53
Resultados .....	55
Discussão.....	58
Conclusão .....	62
Materiais e Métodos.....	63
Referências Bibliográficas.....	69
Considerações Finais.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>BMP15</b>	Proteína Morfogenética Óssea 15
<b>BSA</b>	Albumina Sérica Bovina
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>CCOs</b>	Complexos <i>Cumulus</i> -Oócito
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás Carbônico
<b>CIV</b>	Cultivo <i>In Vitro</i>
<b>eCG</b>	Gonadotrofina Coriônica equina
<b>EGF</b>	Fator de Crescimento Epidermal
<b>FIV</b>	Fertilização <i>In Vitro</i>
<b>FSH</b>	Hormônio Folículo Estimulante
<b>FSHR</b>	Receptor de Hormônio Folículo Estimulante
<b>g</b>	Força gravitacional
<b>G</b>	Gauge (unidade de massa)
<b>GDF9</b>	Fator de Diferenciação e Crescimento 9
<b>hCG</b>	Gonadotrofina Coriônica humana
<b>hpi</b>	horas pós-inseminação
<b>Kg</b>	Kilograma
<b>LH</b>	Hormônio Luteinizante
<b>LHR</b>	Receptor de Hormônio Luteinizante
<b>Mg</b>	Miligrama
<b>Min.</b>	Minuto

<b>MIV</b>	Maturação <i>In Vitro</i>
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MAPK</b>	Proteína Cinase Ativada por Mitógenos
<b>MPF</b>	Fator Promotor de Maturação
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>PHE</b>	Penicilamina, Hipotaurina e Epinefrina
<b>PKA</b>	Proteína Cinase A
<b>PKC</b>	Proteína Cinase C
<b>PIV</b>	Produção <i>In Vitro</i>
<b>RNAm</b>	Ácido Ribonucleico mensageiro
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SOF</b>	Fluido Sintético de Oviduto
<b>SPOM</b>	Simulação fisiológica da maturação oocitária
<b>TALP</b>	Tyrode's Albumin-Lactate-Pyruvato
<b>TCM 199</b>	Meio para Cultivo Tecidual 199
<b>UI</b>	Unidade(s) Internacional(is)
<b>v/v</b>	Volume/Volume

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Taxa de clivagem, blastocistos e blastocistos eclodidos dos grupos experimentais (E1, E2, E3, E4 e E5) e Controle positivo (C+) no Experimento 1. Média±DP.....55
- Tabela 2:** Taxa de clivagem, blastocistos e blastocistos eclodidos dos grupos experimentais (H1, H2, H3, H4 e H5) e Controle positivo (C+) no Experimento 1. Média±DP.....56
- Tabela 3:** Taxa de clivagem, blastocistos e blastocistos eclodidos dos grupos experimentais do Experimento 2. Média±DP .....57
- Tabela 4:** Taxa de clivagem, blastocistos e blastocistos eclodidos dos grupos experimentais na presença FSH ou LH, sem suplementação proteica (Experimento 3). Média±DP .....58

# *Capítulo 1*

*Resumo e Abstract*

*Introdução*

*Hipóteses e Objetivos*

*Revisão de Literatura*

*Referências Bibliográficas*

*Resumo e Abstract*



## SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE MATURAÇÃO COM GONADOTROFINAS PLACENTÁRIAS NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE BLASTOCISTOS BOVINOS

### RESUMO

A maturação *in vitro* (MIV) é considerada uma das etapas mais desafiadoras da produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos. O meio de MIV deve fornecer condições necessárias para que a maturação citoplasmática e nuclear ocorra de modo próximo ao fisiológico. As gonadotrofinas hipofisárias são essenciais para que o oócito adquira (*in vivo*) a competência para ser fertilizado; entretanto, se as gonadotrofinas (hipofisárias ou coriônicas) são essenciais, na MIV, as concentrações a serem utilizadas ainda são controversas. Os objetivos, com este estudo, foram estabelecer concentrações otimizadas de gonadotrofinas coriônicas (eCG e hCG) para a substituição daquelas comumente utilizadas de FSH e LH; comparar o efeito de baixas concentrações de eCG e/ou de hCG, isoladamente ou em conjunto com gonadotrofinas hipofisárias; e analisar a necessidade da utilização do FSH e do LH, individualmente, na PIV de embriões livre de suplementação proteica. Complexos *cumulus*-oócito (CCOs) obtidos de ovários de vacas provenientes de abatedouro, foram selecionados e utilizados em três experimentos: 1) CCOs maturados em meio MIV com seis concentrações distintas de eCG (0; 0,015; 0,15; 1,3; 1,5 e 4 UI mL<sup>-1</sup>) dando origem aos grupos experimentais (C+; E1; E2; E3; E4 e E5, respectivamente), e seis concentrações distintas de hCG (0; 0,05; 0,5; 0,67; 2 e 5 UI mL<sup>-1</sup>), originando também seis grupos experimentais (C+; H1; H2; H3; H4 e H5, respectivamente); 2) Meio MIV com concentrações mínimas funcionais de eCG e hCG obtidas no experimento anterior, resultando em sete grupos experimentais: sem quaisquer gonadotrofinas; apenas eCG (0,015 UI mL<sup>-1</sup>); apenas hCG (0,05 UI mL<sup>-1</sup>); eCG mais

hCG; eCG mais LH; hCG mais FSH; e SFB com FSH ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e LH ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); e 3) MIV na presença de FSH ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ou LH ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) sem nenhuma suplementação proteica. Os CCOs maturados foram fertilizados e cultivados em incubadora ( $38,3 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  e umidade máxima). O desenvolvimento embrionário foi avaliado mediante as taxas de clivagem, de blastocisto e de eclosão (às 72, 168 e 240 horas pós-inseminação, respectivamente). As taxas médias das replicatas foram analisadas mediante Qui-Quadrado e ANOVA e a significância foi considerada quando  $P < 0,05$ . No Experimento 1, a utilização das gonadotrofinas coriônicas resultou em taxas de clivagem, de blastocisto e de eclosão semelhantes às do grupo controle, isoladamente ou em conjunto com gonadotrofinas hipofisárias; no Experimento 2, a ausência de gonadotrofinas no meio de maturação, resultou em taxa de blastocisto (24%) semelhante às dos grupos contendo gonadotrofinas hipofisárias e/ou coriônicas; e em relação à utilização do FSH e do LH no meio de MIV livre de suplementação proteica (Experimento 3), as taxas de desenvolvimento embrionário mantiveram-se semelhantes entre si. A origem, a concentração e a combinação de gonadotrofinas utilizadas na MIV de oócitos bovinos, parece não interferir na taxa de produção e de eclosão de blastocistos, quando avaliados morfológicamente. Nas condições experimentais do presente trabalho, pode ser inferido que qualquer uma das gonadotrofinas utilizadas - isoladas ou em conjunto e a despeito de sua concentração - promoveu a MIV dos oócitos bovinos.

**Palavras-chave:** Gonadotrofinas, hCG, eCG, Maturação *in vitro*, Blastocisto, *Bos indicus*

# SUPPLEMENTATION OF MATURATION MEDIUM WITH CHORIONIC GONADOTROPINS ON THE *IN VITRO* PRODUCTION OF BOVINE BLASTOCYSTS

## ABSTRACT

The *in vitro* maturation (IVM) is considered one of the most challenging steps of *in vitro* production (IVP) of bovine embryos. The IVM medium must provide the conditions required for nuclear and cytoplasmic maturation to occur similarly to physiological. The pituitary gonadotropins are essential components that enable oocytes for fertilization (*in vivo*), but as the gonadotropins (pituitary or chorionic) are essential for IVM, their employed concentrations are still indefinite. We aimed to establish optimal concentrations of chorionic gonadotropin (eCG and hCG) to replace those of FSH and LH commonly used; to compare the effect of low concentrations of eCG and/or hCG alone or in combination with pituitary gonadotropins; and to analyze how necessary is the use of FSH and LH, individually, on the IVP of embryos free from any protein source. *Cumulus*-oocyte complexes (COCs), obtained from ovaries of slaughterhouse were selected and used in three experiments: 1) COCs matured on the IVM medium with six different concentrations of eCG (0, 0.015, 0.15, 1.3; 1.5 and 4 IU ml<sup>-1</sup>) yielding the experimental groups (C +, E1, E2, E3, E4 and E5, respectively) and six different concentrations of hCG (0, 0.05, 0.5, 0, 67, 2 and 5 IU ml<sup>-1</sup>), also yielding six experimental groups (C +, H1, H2, H3, H4 and H5, respectively); 2) IVM medium with minimal concentrations functional of eCG and hCG obtained in the previous experiment, resulting in seven groups: without any gonadotropin; only eCG (0.015 IU mL<sup>-1</sup>); only hCG (0.05 IU mL<sup>-1</sup>); eCG plus hCG, eCG plus LH; hCG plus FSH; FCS with FSH (0.5 mg ml<sup>-1</sup>) and LH (5 mg ml<sup>-1</sup>); and 3)

IVM in the presence of FSH (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) or LH (5 mg ml<sup>-1</sup>), without protein supplementation. The matured COCs were fertilized and cultured in incubator (38.3 °C, 5% CO<sub>2</sub> and maximum humidity). Embryo development was evaluated in terms of cleavage, blastocyst and hatching rates (at 72, 168 and 240 hours post-insemination, respectively). Mean rates of replicates were analyzed by Chi-Square and ANOVA and significance was considered when P <0.05. In Experiment 1, the use of chorionic gonadotropins resulted in cleavage, blastocyst and hatching rates similar to those of the control group, alone or in combination with pituitary gonadotropins; In Experiment 2, the absence of gonadotropins on the IVM resulted in blastocyst rate (24%) similar to those of groups containing pituitary and/or chorionic gonadotropins; and regarding the use of FSH and LH on the IVM medium free from protein supplementation (Experiment 3), the rates of embryonic development remained similar. The origin, concentration and combination of gonadotropins used on the IVM of bovine oocytes do not seem to be decisive on the production and hatching of bovine blastocyst after morphological evaluation. Thus, under these experimental conditions, we infer that any of the gonadotropins used - alone or combined and despite their concentration – allowed for the IVM of bovine oocytes.

**Keywords:** Gonadotropins, hCG, eCG, *in vitro* maturation, Blastocyst, *Bos indicus*



## INTRODUÇÃO

A biotecnologia da reprodução assistida em animais, especialmente as técnicas envolvendo a produção *in vitro* de embriões (PIV), contribui para o melhoramento genético animal e é uma importante ferramenta para aumentar a eficiência da pecuária, proporcionando o aproveitamento mais racional das áreas destinadas à bovinocultura (BASSO *et al.*, 2010). Esforços têm sido direcionados ao aperfeiçoamento das etapas e meios envolvidos na PIV desde o primeiro sucesso com a aplicação da técnica de fertilização *in vitro* (FIV) em bovinos (BRACKETT *et al.*, 1982).

Na espécie bovina, os estudos dos sistemas de PIV de embriões foram fundamentais para a compreensão de vários fenômenos e mecanismos biológicos que ocorrem durante a maturação oocitária, a capacitação espermática e a fertilização, além do desenvolvimento embrionário até estágios pré-implantacionais (BRACKETT *et al.*, 1982; LEIBFRIED-RUTLEDGE *et al.*, 1987; SIRARD *et al.*, 1989; SAGIRKAYA *et al.*, 2007). Segundo dados da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, até o ano de 2007, o Brasil já havia realizado, aproximadamente, 80% do total das transferências de embriões bovinos produzidos *in vitro* no mundo.

Dentre as etapas da PIV, a maturação *in vitro* (MIV) exerce extrema importância se levarmos em conta que a maturação completa do oócito, ou seja, nuclear, citoplasmática e molecular, é essencial para o desenvolvimento embrionário. Durante a maturação, o oócito torna-se competente para ser fertilizado e continuar seu desenvolvimento (HYTTEL *et al.*, 1997; BEVERS *et al.*, 1997; van den HURK & ZHAO, 2005). Nos últimos anos, os protocolos de MIV utilizados em laboratórios pouco mudaram em sua essência, sendo estes considerados menos

eficientes que a maturação obtida *in vivo*, em termos de embriões e recém-nascidos (LONERGAN *et al.*, 2003; EPPIG *et al.*, 2009; GILCHRIST, 2011). Segundo um estudo feito por Lonergan *et al.* (2003), cerca de 40% dos oócitos bovinos maturados, fertilizados e cultivados *in vitro* desenvolvem-se até blastocisto. Em contrapartida, os oócitos maturados *in vivo*, fecundados e cultivados *in vitro* podem se desenvolver até o estágio de blastocisto em taxas de até 80% (BLONDIN *et al.*, 2002). Por esses fatos, pode-se perceber uma limitação para a utilização mais abrangente desta técnica, na produção de embriões visando o melhoramento genético animal (GILCHRIST, 2011).

Conhecimentos recentes dos processos moleculares e celulares - que regulam a maturação *in vivo* dos oócitos, da aquisição de competência de desenvolvimento pelo oócito e das interações oócito e células foliculares ovarianas - proporcionaram oportunidades para o desenvolvimento de novas abordagens para a MIV na espécie bovina. Para tanto é necessário que o meio de cultivo do oócito forneça condições adequadas para que a maturação citoplasmática, nuclear e molecular ocorra de modo próximo ao fisiológico (TAKAGI *et al.*, 1998; GILCHRIST, 2011).

*In vitro*, oócitos bovinos imaturos, quando removidos dos folículos ovarianos, realizam maturação nuclear espontânea sem qualquer estímulo hormonal gonadotrófico (PINCUS & ENZMANN, 1935). Entretanto, na ausência de gonadotrofinas, os oócitos não atingem o desenvolvimento completo até o estágio de blastocisto (SANBUISHO & THRELFALL, 1990; BRACKETT & ZUELKE, 1993).

A adição de gonadotrofinas e de esteróides no meio da MIV, tem a finalidade de estimular o desenvolvimento embrionário dos oócitos bovinos (GUIXUE *et al.*, 2001), entretanto existem variações entre os diferentes protocolos e, embora

seja um consenso entre vários autores (FUKUSHIMA & FUKUI, 1985; FUKUI & ONO, 1989; ZUELKE & BRACKETT, 1993; COELHO *et al.*, 1998), esse tipo de suplementação não é uma unanimidade quanto à concentração e o tipo de gonadotrofina a ser utilizada (BRACKETT *et al.*, 1989; SANBUISSHO *et al.*, 1990; SAEKI *et al.*, 1991; COELHO *et al.*, 1998; COELHO *et al.*, 2002).

A comprovação da real necessidade da utilização das gonadotrofinas hipofisárias e/ou coriônicas, bem como a concentração ideal de hCG e eCG, pode ser útil na tentativa de melhorar a eficiência da MIV e, conseqüentemente, a PIV de embriões bovinos, frente a um novo modelo de uma simulação fisiológica da maturação oocitária (SPOM; ALBUZ *et al.*, 2010).

Diante deste painel complexo e multifatorial que envolve o uso de gonadotrofinas na MIV de oócitos bovinos, o presente trabalho propõe um estudo mais aprofundado sobre a importância destes hormônios durante esse processo.



*Hipótese e Objetivos*

## **HIPÓTESE**

Oócitos bovinos submetidos ao processo de MIV em meio suplementado com hormônios hipofisários e/ou coriônicos, em diferentes combinações e concentrações, podem sustentar a produção de blastocistos de maneira semelhante.

## **OBJETIVOS**

O presente trabalho propõe um estudo mais aprofundado sobre a importância das gonadotrofinas, durante a MIV, e seus posteriores efeitos na PIV de blastocistos bovinos.

Os objetivos específicos foram *i)* estabelecer concentrações otimizadas de gonadotrofinas coriônicas (eCG e hCG) para a substituição daquelas comumente utilizadas de FSH e LH; *ii)* comparar o efeito de baixas concentrações de eCG e/ou de hCG, isoladamente ou em conjunto com gonadotrofinas hipofisárias; e *iii)* analisar a necessidade da utilização do FSH e do LH, individualmente, na PIV de embriões bovinos livre de suplementação proteica.



## REVISÃO DE LITERATURA

Grande parte dos resultados encontrados na literatura demonstra que a adição de gonadotrofinas ao meio de maturação de oócitos aumenta a capacidade de fertilização do oócito e melhora o posterior desenvolvimento embrionário nas espécies bovina e suína (FUKUSHIMA & FUKUI, 1985; BRACKETT *et al.*, 1989; ZUELKE & BRACKETT, 1990; SAEKI *et al.*, 1991; SHA *et al.*, 2010). Esses benefícios são devidos às ações específicas que cada hormônio exerce, seja maximizando a porcentagem de oócitos que completam a meiose ou aumentando a capacidade de fertilização e de desenvolvimento embrionário (FUKUSHIMA & FUKUI, 1989; FUKUI & ONO, 1989; SAEKI *et al.*, 1991; ZUELKE & BRACKETT, 1993; GONÇALVES *et al.*, 2002; GORDON, 2003;).

Com o objetivo de otimizar as taxas de maturação *in vitro*, diversos métodos têm sido estudados, dentre eles a adição ao meio de cultura de fatores de crescimento (HARPER & BRACKETT, 1993; YEO *et al.*, 2008), soro fetal bovino (GLIEDT *et al.*, 1996; RIZOS *et al.*, 2003), albumina sérica bovina (BSA; ALI & SIRARD, 2002), hormônios purificados ou recombinantes (MARTINS Jr. *et al.*, 1998; ANDERIESZ *et al.*, 2000; SILVESTRE *et al.*, 2007), aminoácidos (LEE *et al.*, 1996; MOORE & BONDIOLI, 1993; CAMARGO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009), em diferentes combinações e concentrações, e ainda, o co-cultivo com células do *cumulus* e da granulosa (FUKUI & ONO, 1989).

O benefício da suplementação do meio de cultura de embriões, durante a MIV, para o desenvolvimento embrionário em diversas espécies-alvo foi testado em coelhos (KANE & FOOTE, 1970), ratos (EPPIG *et al.*, 1992), ovinos (WALKER *et al.*, 1996), equinos (DELL'AQUILA *et al.* 1997; CONSIGLIO *et al.*, 2009), bubalinos

(TOTEY *et al.*, 1992; SANTOS *et al.*, 2002) e bovinos (FUKUI & ONO, 1989; PINYOPUMMINTR & BAVISTER, 1994; KESKINTEPE & BRACKETT, 1996; SAGIRKAYA *et al.*, 2007).

Em relação às gonadotrofinas, existe a unanimidade de ser necessário acrescentar ao meio de MIV o LH (Hormônio Luteinizante; BRACKETT *et al.*, 1989; YOUNIS *et al.*, 1989), o FSH (Hormônio Folículo Estimulante; YOUNIS *et al.*, 1989; ALVES *et al.*, 2001, CALDER *et al.*, 2003), ou ambas (FUKUSHIMA & FUKUI, 1985; SAEKI *et al.*, 1991; CHOI *et al.*, 2000; CALDER *et al.*, 2003) purificadas ou recombinantes.

Além do LH e do FSH, há moléculas que podem mimetizar as ações biológicas dessas gonadotrofinas hipofisárias, como a eCG (Gonadotrofina Coriônica equina), gonadotrofina placentária que apresenta a singularidade de possuir dupla ação biológica em bovinos, isto é, uma ação majoritária de estímulo semelhante ao FSH associada com um estímulo menos pronunciado semelhante ao LH (PAPKOFF, 1974). Quando administrado *in vivo*, a eCG estimula o desenvolvimento folicular e a síntese de estradiol pelas células da granulosa. Outra molécula - mimética da ação do LH - utilizada em alguns protocolos de indução da ovulação *in vivo* é a hCG (Gonadotrofina Coriônica humana; BERTAN *et al.*, 2006) que, pelo efeito biológico semelhante ao do LH, estimula as células da teca a produzir andrógenos, durante o crescimento folicular, bem como induz a ovulação de folículos pré-ovulatórios (MORROW, 1986).

Embora, em bovinos, a maturação *in vivo* (isto é, durante o tratamento superestimulatório ovariano) possa ser realizada com a eCG, estudos demonstraram que o tratamento, com esta gonadotrofina, realizado mais de duas vezes em um mesmo animal causa uma redução na resposta aos tratamentos subsequentes

(SAUMANDE *et al.*, 1978; LOSEKE & SPANEL-BOROWSKI, 1996; CORTELL & VIUDES DE CASTRO, 2008). Essa resposta reduzida está relacionada com a produção de anticorpos anti-eCG pelos animais (BOITI *et al.*, 1995; SWANSON *et al.*, 1996), em resposta ao estímulo antigênico dessa molécula exógena e de sua longa meia-vida na circulação das doadoras bovinas. Na espécie bovina, a hCG é usada, mais frequentemente, *in vivo* para a indução da ovulação e na MIV pela sua ação LH, ainda que sua ação e cinética *in vitro* não tenham sido completamente exploradas nem elucidadas. A maturação *in vivo* de folículos ovarianos nesta espécie, nos estágios próximos de seu diâmetro pré-ovulatório e durante o tratamento superestimulatório, foi testada, com resultados positivos, mediante a administração de eCG ou de LH, este último isolado ou associado ao FSH hipofisário (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Desse modo, embora o uso *in vivo* dos ligantes do receptor do LH (LH, hCG e, com menor afinidade, a eCG) tenham sido testados quer para o crescimento inicial de folículos antrais (eCG), quer para a maturação final folicular (LH ou eCG), quer para a indução da ovulação (LH ou hCG), os efeitos biológicos desses mesmos ligantes na MIV foram pouco explorados. É sabido que embora haja um único receptor do LH (LHR), diferentes ligantes desse receptor podem ativar distintas vias de sinalização ou com intensidades diferentes (revisto por NOGUEIRA *et al.*, 2010).

Em relação ao FSH, recentemente a importância da concentração deste hormônio no meio de maturação oocitária *in vitro* (Simulação fisiológica da maturação oocitária, ou SPOM; ALBUZ *et al.*, 2010) voltou a ser descrita. Entretanto, ainda que uma alta concentração de FSH tenha sido descrita para o protocolo SPOM, a concentração ideal desse hormônio, a possibilidade de mimetizar a sua ação com moléculas de origem coriônica (eCG), a real necessidade do LH (ou da

hCG) na MIV e o sinergismo, ou não, dessas gonadotrofinas hipofisárias e coriônicas, não estão adequadamente investigadas nem por este autor nem pelas demais publicações revisadas.

### ***Maturação oocitária (nuclear, citoplasmática e molecular)***

A diferenciação das células da linhagem germinativa feminina e a formação dos folículos primários ocorrem, basicamente, na fase embrionária ou fetal dependendo da espécie, isto é, algumas espécies (p.ex., bovina) já nascem com um número determinado de oócitos primários (imaturos e diplóides), que passarão pelo processo meiótico de diferenciação e se tornarão oócitos secundários (maduros e haplóides), somente nos ciclos ovulatórios, na maturidade sexual do animal (MOORE & PERSAUD, 1994). Durante todo este período, os oócitos permanecem em núcleo dictiado da prófase - da meiose I - e sofrem diversas alterações estimuladas por hormônios gonadotróficos, durante a fase antral folicular (MERTON *et al.*, 2003).

A retomada da meiose, *in vivo*, ocorre com o pico pré-ovulatório de LH durante o estro e, *in vitro*, os oócitos reiniciam a meiose espontaneamente com a simples retirada do oócito do ambiente folicular e em meio de maturação apropriado (GORDON, 2003). A competência do oócito, no interior dos folículos, está intimamente ligada com as células da granulosa que o cerca e dão origem ao complexo *cumulus*-oócito (CCO), mantendo entre si uma estreita comunicação através das junções comunicantes (GAP junctions; EPPIG *et al.*, 2001).

A maturação nuclear, na espécie bovina, requer entre 18 e 24 horas (MERTON *et al.*, 2003) e compreende a progressão do estágio de diplóteno da

prófase I meiótica (oócito primário) até a fase de metáfase II, no oócito secundário (BEVERS *et al.*, 1997). Ao mesmo tempo, modificações citoplasmáticas são observadas no oócito e são essenciais para uma fertilização monospermica e subsequente desenvolvimento embrionário (HYTTEL *et al.*, 1997).

Na maturação nuclear - e sob a influência do LH e FSH do pico pré-ovulatório - a progressão envolve a quebra da vesícula germinativa (o núcleo dictiado, ou seja, a membrana nuclear do oócito), a condensação dos cromossomos, a extrusão do primeiro corpúsculo polar e a formação do fuso meiótico da metáfase II (MEINECKE *et al.*, 2001).

Concomitantemente, a maturação citoplasmática é a responsável pelas alterações estruturais, moleculares e bioquímicas no citoplasma que garantem a competência, do oócito, para ser fertilizado e se desenvolver. Essas modificações incluem a reorganização de organelas como os grânulos corticais, as mitocôndrias, as gotículas de lipídeos, a localização excêntrica do núcleo, o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático (HYTTEL *et al.*, 1997; van den HURK & ZHAO, 2005), a síntese de proteínas e modificações moleculares (SIRARD *et al.*, 1998; KUBELKA *et al.*, 2000).

A maturação molecular ocorre durante a maturação citoplasmática, quando há um aumento exacerbado na atividade das cinases - enzimas envolvidas nos processos de fosforilação de determinadas proteínas – iniciando uma complexa cascata de fosforilação e desfosforilação de proteínas específicas envolvidas na regulação do ciclo celular. As cinases mais importantes neste processo são o fator promotor de maturação (MPF) e a família da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK). Somente os oócitos com o crescimento completo possuem competência



para ativar efetivamente as duas vias do ciclo celular e finalizar o processo de maturação (GOTTARDI & MINGOTI, 2009).

### ***Hormônios gonadotróficos***

Os dois principais hormônios gonadotróficos são o LH e o FSH. De acordo com Brown e McNeilly (1999), o LH e o FSH são glicoproteínas heterodímeras produzidas e secretadas pelas células gonadotróficas localizadas na hipófise anterior, compostas por uma subunidade  $\alpha$  comum e uma  $\beta$  específica para cada um desses hormônios.

O LH tem como função básica promover a maturação final oocitária, a ovulação e estimular a luteinização das células da granulosa e da teca em folículos ovulatórios e pós-ovulação (luteogênese), enquanto que o FSH estimula a proliferação e diferenciação das células da granulosa, induz a formação do antro e, desse modo, promove o crescimento folicular (RICHARDS, 1980). Ambos, portanto, estão intimamente relacionados com o desenvolvimento folicular e a regulação da esteroidogênese ovariana e podem ser considerados essenciais para o crescimento folicular *in vivo*.

Em camundongas, Barnett *et al.* (2006) demonstraram que mutações de genes que controlam a expressão das gonadotrofinas, e de seus receptores, afetam diretamente a ovulação, a formação de corpo lúteo, além de interferir no processo de formação e crescimento de folículos primordiais e na atresia folicular. Além disso, foi demonstrado que é maior o número de folículos secundários, cultivados *in vitro*, que se desenvolvem quando gonadotrofinas são adicionadas ao meio (van den HURK & ZHAO, 2005).

Outro hormônio glicoprotéico que ganhou importância nos últimos anos, na MIV de oócitos bovinos, é a hCG. Jagiello e Ducayen (1977) começaram a estudar a importância desta gonadotrofina na maturação de oócitos *in vitro* com a justificativa de que havia receptores associados a estes hormônios nas células dos CCOs. De acordo com Gharib *et al.* (1990) o LH e a hCG possuem estruturas químicas similares e podem promover a formação do complexo hormônio-receptor se ligando a receptores homólogos. A utilização da hCG é considerada uma alternativa para minimizar os custos da MIV de oócitos bovinos (HENSLEIGH & HUNTER, 1985).

A eCG, antigamente conhecido como PMSG (pregnant mare serum gonadotropin), é outra gonadotrofina placentária utilizada na MIV de oócitos bovinos (OCAÑA QUERO *et al.*, 1999; COELHO *et al.*, 2002) quer pela sua ação FSH, quer por possuir atividades semelhantes ao FSH e ao LH na mesma molécula (PAPKOFF, 1974). Entretanto, tem maior importância na manipulação do ciclo estral e na indução da superestimulação em espécies economicamente importantes, como a ovina e a suína (ALEIXO *et al.*, 1995).

### **Receptores de gonadotrofinas**

Em bovinos, os receptores específicos de FSH (FSHR) e LH (LHR) são encontrados, respectivamente, nas células da granulosa e da teca dos folículos ovarianos (FORTUNE *et al.*, 1988), durante os estágios iniciais do desenvolvimento e antes da aquisição da dominância folicular (revisto em NOGUEIRA *et al.*, 2010). Em estágios mais tardios do desenvolvimento folicular - isto é, após o desvio e a instalação da dominância folicular - os receptores de LH podem ser detectados

também nas células da granulosa (RICHARDS, 1980; NOGUEIRA *et al.*, 2010). Os FSHRs e LHRs são estruturas compostas por um grande domínio extracelular (N-terminal), sete domínios transmembrânicos e um pequeno domínio (C-terminal) intracelular acoplado a uma proteína G trimérica (SALESSE *et al.*, 1991; HUHTANIEMI, 2000).

O FSHR, ligado ao FSH, controla várias funções celulares mediante a ativação das cascatas de fosforilações de substratos protéicos e regula a expressão de alguns fatores de crescimento essenciais durante o processo de crescimento folicular, tais como o fator de diferenciação e crescimento 9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea 15 (BMP-15) (THOMAS *et al.*, 2005). A eCG, por possuir dupla bioatividade, pode se ligar tanto ao FSHR quanto ao LHR (com maior e menor afinidade, respectivamente) desencadeando reações intracelulares FSH símile, porém distinta da ligação apenas com o FSH (MORROW, 1986).

Em relação ao LHR, dependendo da isoforma de RNAm que traduzir o receptor, este pode passar a ser ativado pela hCG e não mais pelo LH (HUHTANIEMI & CATT, 1981; ALVAREZ *et al.*, 1999), conferindo uma diferenciação molecular de ligação (*binding*) entre dois ligantes de um mesmo receptor. Em uma revisão feita por Nogueira *et al.* (2010) fica evidente que a ativação do LHR pode desencadear diversas vias de resposta celular mediadas por diferentes proteínas G ( $G_s$  e  $G_q$ ), na dependência da concentração e do ligante utilizado e da abundância do receptor na superfície celular. Essas vias celulares culminam em ativar as cascatas de fosforilações das proteínas quinases A e C (PKA e PKC) as quais, por sua vez, podem promover distintas respostas biológicas como a mitose de células da granulosa e a síntese de estradiol ou o processo da ovulação.

*Referências Bibliográficas*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUZ, F.K.; SASSEVILLE, M.; LANE, M.; ARMSTRONG, D.T.; THOMPSON, J.G.; GILCHRIST, R.B. 2010. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Hum. Reprod.*, 25: 2999-3011.
- ALEIXO, J.A.G.; DESCHAMPS, J.C; BORDIGNON, V. 1995. Gonadotrofina coriônica equina. Purificação, caracterização e resposta ovariana em ovinos e suínos. *Ciência Rural*, 25: 111-114.
- ALI, A.; SIRARD, M.A. 2002. Effect of the Absence or Presence of Various Protein Supplements on Further Development of Bovine Oocytes During *In Vitro* Maturation. *Biol. Reprod.*, 66: 901-905.
- ALVAREZ, C.A.; NARAYAN, P.; HUANG, J.; PUETT, D. 1999. Characterization of a region of the lutropin receptor extracellular domain near transmembrane helix 1 that is important in ligand-mediated signaling. *Endocrinology*, 140: 1775-1782.
- ALVES, J.D.R.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; CALDAS, J.G.L.; SANTOS FILHO, A.S.; BARRETO, M.B.P. 2001. Altas concentrações de FSH-p na maturação *in vitro* de oócitos *Bos indicus*. *Ciência Rural*, 31: 645-649.
- ANDERIESZ, C.; FERRARETTI, A.P.; MAGLI, C.; FIORENTINO, A.; FORTINI, D.; GIANAROLI, L.; JONES, G.M.; TROUNSON, A.O. 2000. Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development *in vitro*. *Hum. Reprod.*, 15: 1140-1148.
- BARNETT, K.R.; SCHILLING, C.; GREENFELD, C.R.; TOMIC, D.; FLAWS, J.A. 2006. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum. Reprod.*, 13: 1-19.

- BASSO, A.C.; SCHNEIDR, K.L.; PONTES, J.H.F. 2010. Novas alternativas para aplicação em larga escala de embriões produzidos *in vitro*. *4ª simpósio internacional de reprodução animal aplicada*.
- BERTAN, C.M.; CESAR, M.C.; PUGINE, S.M.P.; BINELLI, M.; VISINTIN, J.A.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.D. 2006. Indução da ovulação em vacas com gonadotrofina coriônica humana (hCG) purificada por cromatografia de afinidade. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 43: 379-386.
- BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; VEN DEN HURK, R.; IZADYAR, F. 1997. Regulation of modulation of oocytes maturation in the bovine. *Theriogenology*, 47: 13-22.
- BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; HERMÉNÉHILDE, T.; BARNES, F.; SIRARD, M.A. 2002. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 66: 38-43.
- BOITI, C.; CASTELLINI, C.; CANALI, C.; ZAMPINI, D.; MONACI, M. 1995. Long term effect of PMSG on rabbit does reproductive performance. *World Rabbit Sci.*, 3: 51-56.
- BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J; EVANS, J.F.; DRESSEL, M.A. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in cow. *Biol. Reprod.*, 27: 147-158.
- BRACKETT, B.G.; YOUNIS, A.I.; FAYRER-HOSKEN, R.A. 1989. Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentrations of luteinizing hormone. *Fertil. Steril.*, 52: 319-324.
- BRACKETT, B.G.; ZUELKE, K.A. 1993. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, 39: 43-64.

- BROWN, P.; McNEILLY, A.S. 1999. Transcriptional regulation of pituitary gonadotrophin subunit genes. *Reprod.*, 4: 117-124.
- CALDER, M.D.; CAVENEY, A.N.; SMITH, L.C.; WATSON, A.J. 2003. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation *in vitro*. *Reprod. Biol. And Endocr.*, 1: 1-14.
- CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; VIANA, J.H.M.; RAMOS, A.A.; FERREIRA, A.M. 2009. Efeito do citrato e taurina em meio CR2aa no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 61: 88-94.
- CHOI, Y.H.; CARNEVALE, E.M.; SEIDEL, G.E.; SQUIRES, E.L. 2001. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology*, 56: 661-670.
- COELHO, L.A.; ESPER, C.R.; ALVAREZ, R.H.; VANTINI, R.; ALMEIDA JR., I.L. 2002. Produção *In Vitro* de Embriões Bovinos: Utilização de Diferentes Fontes de Gonadotrofinas na Maturação dos Oócitos. *R. Bras. Zootec.*, 31: 1117-1121.
- COELHO, L.A.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; VANTINI, R.; SILVA FILHO, I.R.; ALMEIDA Jr., I.L. 1998. Avaliação das condições de maturação oocitária e do efeito do reprodutor na produção *in vitro* de embriões bovinos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 35: 120-122.
- CONSIGLIO, A.L.; DELL'AQUILA, M.E.; FIANDANESE, N.; AMBRUOSI, B.; CHO, Y.S.; BOSI, G.; ARRIGHI, S.; LACALANDRA, G.M.; CREMONESI, F. 2009. Effects of leptin on *in vitro* maturation, fertilization and embryonic cleavage after ICSI and early developmental expression of leptin (Ob) and leptin receptor (ObR) proteins in the horse. *Reprod. Biol. and Endocr.*, 7: 113.

- CORTELL, C.; VIUDES DE CASTRO, M.P. 2008. Immune response to repeated rhFSH superovulation treatment in rabbit does. *In: Proceedings of the 9<sup>th</sup> World Rabbit Congress*, Verona, Italy, 333-337.
- DELL'AQUILA, M.E.; CHO, Y.S.; MINOIA, P.; TRAINA, V.; LACALANDRA, G.M.; MARITATO, F. 1997. Effects of follicular fluid supplementation of *in vitro* maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 12: 2766-2772.
- EPPIG, J.J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reprod.*, 122: 829-838.
- EPPIG, J.J.; SCHROEDER, C.; O'BRIEN, M.J. 1992. Developmental capacity of mouse oocytes matured *in vitro*: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. *J. Reprod. Fert.*, 95: 119-127.
- FORTUNE, J.E.; SIROIS, J.; Quirk, S.M. 1988. The growth and differentiation of follicles during the bovine estrous cycle. *Theriogenology*, 29: 95-109.
- FUKUI, Y.; ONO, H. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in-vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 86: 501-506.
- FUKUSHIMA, M.; FUKUI, Y. 1985. Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability extrafollicular bovine oocytes cultured *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, 9: 323-332.
- GHARIB, S.D.; WIERMAN, M.E.; SHUPNIK M.A.; CHIN, W.W. 1990. Molecular biology of the pituitary gonadotrophins. *Endocrinology*, 1: 177-197.



- GILCHRIST, R.B. 2011. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to *in vitro* maturation. *Reprod. Fertil. Develop.*, 23: 23-31.
- GLIEDT, D.W.; ROSENKRANS JR., C.F.; RORIE, R.W.; MUNYON, A.L.; PIERSON, J.N.; MILLER, G.F.; RAKES, J.M. 1996. Effects of media, serum, oviductal cells, and hormones during maturation on bovine embryo development *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, 79: 536-542.
- GONÇALVES, P.B.D.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L.; MONTAGNER, M.M.; COSTA, L.F.S. 2002. Produção *in vitro* de embriões. In: *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*, 10: 195-226.
- GORDON, I. 2003. Laboratory production of cattle embryos, 2<sup>nd</sup> Edition. Cambridge: CABI Publishing.
- GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. 2009. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 33: 82-94.
- GUIXUE, Z.; LUCIANO, A.M.; COENEN, K.; GANDOLFI, F.; SIRARD, M.A. 2001. The influence of cAMP before or during oocyte maturation on embryonic developmental competence. *Theriogenology*, 55: 1733-1743.
- HARPER, K. M., G. BRACKETT. 1993. Bovine blastocysts development after *in vitro* maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biol. Reprod.*, 48: 409-416.
- HENSLEIGH, H.C.; HUNTER, A.G. 1985. *In vitro* maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent *in vitro* fertilization and cleavage. *J Dairy Sci.*, 68: 1456-1462.

- HUHTANIEMI, I. 2000. Mutations of gonadotrophin and gonadotrophin receptor genes: what do they teach us about reproductive physiology? *J. Reprod. Fert.*, 119: 173-186.
- HUHTANIEMI, I.T.; CATT, K.J. 1981. Differential binding affinities of rat testis luteinizing hormone (LH) receptors for human chorionic gonadotropin, human LH, and ovine LH. *Endocrinology*, 108: 1931-1938.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47: 23-32.
- JAGIELLO, G.; DUCAYEN, M.B. 1977. Preliminary evidence for the intracellular localization of luteinizing hormones in mammalian oocytes. *J. Exp. Zool. Philadelphia*, 201: 345.
- KANE, M.T.; FOOTE, R.H. 1970. Culture of two and four cell rabbit embryos to the blastocyst stage in serum and serum extracts. *Biol. Reprod.*, 2: 245-250.
- KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. 1996. *In vitro* developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol. Reprod.*, 55: 333-339.
- KUBELKA, M.; MOTLÍK, J.; RICHARD, M.S.; ANTONÍN, P. 2000. Butyrolactone I Reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. *Biol. Reprod.*, 62: 292-302.
- LEE, E.S.; FUKUI, Y. 1996. Synergistic Effect of Alanine and Glycine on Bovine Embryos Cultured in a Chemically Defined Medium and Amino Acid Uptake by *In Vitro*-Produced Bovine Morulae and Blastocysts. *Biol. Reprod.*, 55: 1383-1389.
- LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRITSER, E.S.; EYESTONE, W.H. 1987. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. *Biol. Reprod.*, 36: 376-383.

- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. 2003. Oocytes and embryo quality: Effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. Dom. Anim.*, 38: 259-267.
- LOSEKE, A.; SPANEL-BOROWSKI, K. 1996. Simple or repeated induction of superovulation: a study on ovulation rates and microvessel corrosion casts in ovaries of golden hamsters. *Ann Anat.*, 178: 5-14.
- MARTINS JR., A.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. 1998. Use of recombinant gonadotropins for bovine embryo production *in vitro*. *Theriogenology*, 49: 292.
- MEINECKE, B.; JANAS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. 2001. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. *Reprod. Dom. Anim.*, 36: 183-188.
- MERTON, J.S.; DE ROOS, A.P.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P.L.; DIELEMAN, S.J. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59: 651-674. Review.
- MOORE, K.; BONDIOLI, K. 1993. Glycine and Alanine Supplementation of Culture Medium Enhances Development of *In Vitro* Matured and Fertilized Cattle Embryos. *Biol. Reprod.*; 48: 833-840.
- MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. 1994. Início do desenvolvimento humano. In *Embriologia Clínica*, 13-38.
- MORROW, D.A. 1986. Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animal. 2ed. Philadelphia Saunders, 460p.

- NOGUEIRA, M.F.G.; FERNANDES, P.; ERENO, R.L.; SIMÕES, R.A.L.; BURATINI JR., J.; BARROS, C.M. 2010. Luteinizing Hormone Receptor (LHR): basic concepts in cattle and other mammals. A review. *Anim. Reprod.*, 7: 51-64.
- OCAÑA QUERO, J.M.; MILLAN, M.M.; MERLIN, M.P.; MARISCAL, M.A.O.; FRANGANILLO, A.R. 1999. *In vitro* bovine embryos production: influence of serum and hormonal supplementation. *Arch. Zootec.*, 48: 71-74.
- OLIVEIRA, A.C.; MATTOS, M.C.C.; BASTOS, M.R.; GONÇALVES, J.R.S.; LUNARDI, L.H.; SURJUS, R.S.; SARTORI, R.; BARROS, C.M. 2011. Efficiency of protocol P-36, associated with equine chorionic gonadotropin or luteinizing hormone administration, in the last day of superstimulatory treatment, in Nellore cows. *Reprod., Fert. and Develop.*, 23: 255.
- PAPKOFF, H. 1974. Chemical and biological properties of the subunits of pregnant mare serum gonadotropin. *Biochem. Biophys. Res. Communic.*, 58: 397-404.
- PINCUS, G.; ENZMANN, E.V. 1935. The comparative behavior on mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Med.*, 62: 665-675.
- PINYOPUMMINTR, T.; BAVISTER, B. D. 1994. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology*, 41: 1241-1249.
- RICHARDS, J.S. 1980. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol. Rev.*, 60: 51-89.
- RIZOS, D.; GÚTIERREZ-ADÁN, A.; PÉREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.*, 68: 236-243.

- SAEKI, K.; HOSHI, M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; FIRST, N.L. 1991. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biology of Reproduction*, 44: 256-260.
- SAGIRKAYA, H.; MISIRLIOGLU, M.; KAYAC, A.; FIRST, N.L.; PARRISH, J.J.; MEMILI, E. 2007. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.*, 101: 225–240.
- SALESSE, R.; REMY, J.J.; LEVIN, J.M.; JALLAL, B.; GARNIER, J. 1991. Towards understanding the glycoprotein hormone receptors. *Biochimie*, 73: 109–120.
- SANBUISSHO, A.; THRELFALL, W.R. 1990. The influence of serum and gonadotropins on MIV and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 34: 341-348.
- SANTOS, S.S.D.; DANTAS, J.K.; MIRANDA, M.S.; BIONDI, F.C.; OHASHI, O.M. 2002. Cinética da maturação nuclear *in vitro* de oócitos bubalinos. *Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.*, 39: 266-270.
- SAUMANDE, J; CHUPIN, D.; MARIAN, J.C.; ORTOVANT, R.; MAULEON, P. 1978. Factors affecting the variability of ovulation rates after PMSG stimulation. *In: Sreenan JM (Ed.). Control of Reproduction in the Cow*, 195-224.
- SHA, W.; XU, B.Z.; LI, M.; LIU, D.; FENG, H.L.; SUN, Q.Y. 2010. Effect of gonadotropins on oocyte maturation *in vitro*: an animal model. *Fert. Steril.*, 93: 1650-1661.
- SILVA, C.; CALEGARI, R.S.; MARTINS JR, A. 2009. Desenvolvimento de embriões bovinos após maturação *in vitro* de oócitos em meio de cultivo suplementado com taurina ou glicina. *Vet. e Zootec.*, 16: 89-100.
- SILVESTRE, M.A.; ALFONSO, J.; GARCÍA-MENGUAL, E.; SALVADOR, I.; DUQUE, C.C.; MOLINA, I. 2007. Effect of recombinant human follicle-stimulating hormone

- and luteinizing hormone on *in vitro* maturation of porcine oocytes evaluated by the subsequent *in vitro* development of embryos obtained by *in vitro* fertilization, intracytoplasmic sperm injection, or parthenogenetic activation. *J. Anim. Sci.*, 85: 1156-1160.
- SIRARD, M.A.; FLORMAN, H.M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; BARNES, F.L.; SIMS, M.L.; FIRST, N.L. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 40: 1257-1263.
- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES M. 1998. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: A review. 1998. *Theriogenology*, 49: 483-497.
- SWANSON, W.F.; ROTH, T.L.; GRAHAM, K.; HOROHOV, D.W.; GODKE, R.A. 1996. Kinetics of the humoral immune response to multiple treatments with exogenous gonadotropins and relation to ovarian responsiveness in domestic cats. *Am. J. Vet. Res.*, 57: 302-307.
- TAKAGI, M.; CHOI, Y.H.; KAMISHITA, H.; ACOSTA, T.J.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.; MIYAMOTO, A.; MIYAZAWA, K.; SATO, K. 1998. Oocyte quality of small antral follicles coexisting with cystic follicles in the ovaries of the cow. *Reprod. Sci.*, 51: 195-203.
- THOMAS, F.H.; ETHIER, J.F.; SHIMASAKI, S.; VANDERHYDEN, B.C. 2005 Follicle stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. *Endocrinology*, 146: 941-949.
- TOTEY, S.M.; SINGH, G.; TANEJA, M.; PAWSHE, C.H.; TALWAR, G.P. 1992. *In vitro* maturation, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Reprod. Fert.*, 95: 597-607.

- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63: 1717-1751.
- WALKER, S.K.; HILL, J.L.; KLEEMAN, D.O.; NANCARROW, C.D. 1996. Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal concentrations. *Biol. Reprod.*, 55: 703-708.
- YEO, C.X.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G.; LANE, M. 2008. Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. *Hum. Reprod.*, 23: 67-73.
- YOUNIS, A.I.; BRACKETT, B.G.; FAYRER-HOSKEN, R.A. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Research*, 23: 189-201.
- ZUELKE, K.A.; BRACKETT, B.G. 1990. Luteinizing hormone-enhanced *in vitro* maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. *Biology of Reproduction*, 43: 784-787.
- ZUELKE, K.A.; BRACKETT, B.G. 1993. Increased glutamine metabolism in bovine cumulus cell-enclosed and denuded oocytes after *in vitro* maturation with luteinizing hormone. *Biol. Reprod.*, 48: 815-820.





## *Capítulo 2*

# **USO DE GONADOTROFINAS NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS E SEUS EFEITOS NA PRODUÇÃO E ECLOSÃO DE BLASTOCISTOS**

Este artigo está de acordo com as normas para publicação no periódico BMC Developmental Biology (BioMed Central open Access), exceto pelo idioma.  
Endereço eletrônico: <http://www.biomedcentral.com/bmcdevbiol>

## **USO DE GONADOTROFINAS NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS E SEUS EFEITOS NA PRODUÇÃO E ECLOSÃO DE BLASTOCISTOS**

Carla Decanine<sup>1,2</sup>, Elisa Mariano Pioltine <sup>2</sup>, Isabele Picada Emanuelli<sup>1,2</sup>, Mariana Fernandes Machado<sup>1</sup>, Ciro Moraes Barros<sup>1</sup>, Marcelo Fábio Gouveia Nogueira<sup>1,2§</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacologia, IB, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas, FCL, UNESP, Assis, São Paulo, Brasil.

§E-mail: marcelo@assis.unesp.br

§Autor para correspondência

Endereços de e-mail:

CD: caca\_decanine@hotmail.com

EMP: elisapioltine@hotmail.com

IPE: isabelevelvet@hotmail.com

MFM: marifmach@ibb.unesp.br

CMB: cmb Barros@ibb.unesp.br

MFGN: marcelo@assis.unesp.br

## **RESUMO**

### **Contexto**

A maturação *in vitro* (MIV) é considerada uma das etapas mais desafiadoras da produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos. O meio de MIV deve fornecer condições necessárias para que a maturação citoplasmática e nuclear ocorra de modo próximo ao fisiológico. As gonadotrofinas hipofisárias são componentes essenciais para que o oócito adquira (*in vivo*) a competência para ser fertilizado; entretanto, se as gonadotrofinas (hipofisárias ou coriônicas) são essenciais, na maturação *in vitro*, as concentrações a serem utilizadas ainda são controversas. Os objetivos, com este estudo, foram estabelecer concentrações otimizadas de gonadotrofinas coriônicas (eCG e hCG) para a substituição daquelas comumente utilizadas de FSH e LH; comparar o efeito de baixas concentrações de eCG e/ou de hCG, isoladamente ou em conjunto com gonadotrofinas hipofisárias; e analisar a necessidade da utilização do FSH e do LH, isolados e sem qualquer fonte proteica, na PIV de embriões.

### **Resultados**

No Experimento 1, a utilização das gonadotrofinas coriônicas – substituindo as hipofisárias na MIV de oócitos bovinos - resultou em taxas de clivagem, de blastocisto e de eclosão semelhantes às daquelas do grupo controle, ainda que utilizando as menores concentrações, isoladamente ou em conjunto com gonadotrofinas hipofisárias. No Experimento 2, a ausência de gonadotrofinas, no meio de maturação, resultou em taxa de blastocisto (24%) semelhante às dos grupos contendo gonadotrofinas hipofisárias e/ou coriônicas (as taxas variaram entre

22 e 31%). Em relação à utilização do FSH e do LH, no meio de maturação oocitária e na ausência de suplementação proteica, as taxas de desenvolvimento embrionário mantiveram-se semelhantes entre si (Experimento 3). Neste experimento, o FSH e o LH sustentaram a produção de blastocistos mesmo quando adicionados isoladamente ao meio de maturação.

### **Conclusões**

A origem, a concentração e a combinação de gonadotrofinas utilizadas na maturação *in vitro*, de oócitos bovinos, parece não interferir de maneira decisiva na taxa de produção e de eclosão de blastocistos, quando avaliados morfológicamente. Assim, nas condições experimentais do presente trabalho inferimos que qualquer uma das gonadotrofinas utilizadas - isoladas ou em conjunto e a despeito de sua concentração - promoveu a MIV dos oócitos bovinos.

**Palavras-chave:** Gonadotrofinas, hCG, eCG, Maturação *in vitro*, Blastocisto, *Bos indicus*

## CONTEXTO

### INTRODUÇÃO

Esforços têm sido direcionados ao aperfeiçoamento das etapas e meios de cultivo envolvidos na produção *in vitro* (PIV) de embriões desde o primeiro sucesso com a aplicação dessa técnica em bovinos [1]. Dentre as etapas da PIV, a maturação *in vitro* (MIV) exerce extrema importância se levarmos em conta que a maturação completa do oócito, ou seja, nuclear, citoplasmática e molecular, é essencial para o desenvolvimento embrionário. Durante a maturação, o oócito torna-se competente para ser fertilizado e continuar seu desenvolvimento [2-4]. Nos últimos anos, os protocolos de MIV utilizados em laboratórios pouco mudaram em sua essência, sendo estes considerados menos eficientes que a maturação obtida *in vivo*, em termos de embriões e recém-nascidos [5-7]. Por essas evidências, percebe-se uma limitação para a utilização mais abrangente desta técnica, na produção de embriões visando o melhoramento genético animal [7].

Conhecimentos recentes dos processos moleculares e celulares - que regulam a maturação *in vivo* dos oócitos, da aquisição de competência de desenvolvimento pelo oócito e das interações oócito e células foliculares ovarianas - proporcionaram oportunidades para o desenvolvimento de novas abordagens para a MIV na espécie bovina. Para tanto é necessário que o meio de cultivo forneça condições adequadas para que a maturação oocitária, citoplasmática e nuclear, ocorra de modo próximo ao fisiológico [7,8].

*In vitro*, oócitos bovinos imaturos, quando removidos dos folículos, realizam maturação nuclear espontânea sem qualquer estímulo hormonal

gonadotrófico [9]. Entretanto, na ausência de gonadotrofinas, os oócitos não atingem o desenvolvimento completo até o estágio de blastocisto [10, 11].

A suplementação do meio de maturação tem, por objetivo, estimular o desenvolvimento *in vitro* [10-19], entretanto existem variações entre os diferentes protocolos de PIV. Na espécie bovina, é consenso a adição de gonadotrofinas hipofisárias (LH e FSH) e coriônicas (eCG e hCG), além de hormônios esteroides ao meio da MIV, porém não há unanimidade quanto à concentração ou o tipo de gonadotrofina a ser utilizada [10-22].

Nas espécies bovina e suína, parece haver um efeito benéfico da adição de gonadotrofinas no meio de maturação dos oócitos, quanto à capacidade de fertilização destes e no posterior desenvolvimento embrionário [13, 15-17, 19, 25]. Esses benefícios são devidos às ações específicas que cada hormônio exerce, seja maximizando a porcentagem de oócitos que completam a meiose ou aumentando a capacidade de fertilização e de desenvolvimento embrionário [13-17, 23-24].

A comprovação da real necessidade da utilização das gonadotrofinas hipofisárias e/ou coriônicas, bem como a concentração ideal de hCG e eCG, pode ser útil na tentativa de melhorar a eficiência da MIV e, conseqüentemente, a PIV de embriões bovinos, frente a um novo modelo de simulação fisiológica da maturação oocitária (SPOM) [26].

Diante deste painel complexo e multifatorial que envolve o uso de gonadotrofinas na MIV de oócitos bovinos, o presente trabalho propõe um estudo mais aprofundado sobre a importância destes hormônios, durante a MIV, e seus posteriores efeitos na PIV de blastocistos bovinos. Neste estudo, os objetivos específicos foram 1) estabelecer concentrações otimizadas de gonadotrofinas

coriônicas (eCG e hCG) para a substituição daquelas comumente utilizadas de FSH e LH; *ii*) comparar o efeito de baixas concentrações de eCG e/ou de hCG, isoladamente ou em conjunto com gonadotrofinas hipofisárias; e *iii*) analisar a necessidade da utilização do FSH e do LH, isolados e sem qualquer fonte proteica.

## RESULTADOS

No Experimento 1, foram determinadas concentrações funcionais e não deletérias das gonadotrofinas coriônicas. Os resultados obtidos neste experimento estão demonstrados nas tabelas 1 e 2, respectivamente para as concentrações de eCG e hCG. Não foi constatada diferença ( $P > 0,05$ ) entre as taxas médias de clivagem, de blastocisto e de eclosão, tanto para os grupos com diferentes concentrações de eCG quanto de hCG. A utilização das gonadotrofinas coriônicas - substituindo as hipofisárias na maturação *in vitro* de oócitos bovinos - resultou em taxas de desenvolvimento embrionário semelhantes às do grupo controle (C+), ainda que nas menores concentrações.

Tabela 1. Taxa de clivagem, blastocistos e blastocistos eclodidos dos grupos experimentais (E1, E2, E3, E4 e E5) e Controle positivo (C+) no Experimento 1.

Média±DP.

	C+	E1	E2	E3	E4	E5
	n=341	n=199	n=202	n=203	n=204	n=192
Clivagem (%)	65±11	57±15	57±17	69±14	65±11	65±10
Blastocisto (%)	30±13	23±9	17±12	26±15	22±8	23±13
Eclosão (%)	16±7	13±7	13±10	14±9	14±6	17±11

Não foram encontradas diferenças significativas

Tabela 2. Taxa de clivagem, blastocistos e blastocistos eclodidos dos grupos experimentais (H1, H2, H3, H4 e H5) e Controle positivo (C+) no Experimento 1. Média±DP.

	C+	H1	H2	H3	H4	H5
	n=555	n=222	n=193	n=190	n=215	n=202
Clivagem (%)	66±13	62±11	60±14	65±10	63±10	61±13
Blastocisto (%)	16±10	19±14	19±23	19±17	16±11	17±16
Eclosão (%)	8±6	8±7	13±15	13±13	8±9	10±10

Não foram encontradas diferenças significativas

No Experimento 2, as menores concentrações funcionais de eCG e hCG determinadas no experimento anterior, foram utilizadas isoladamente ou em conjunto com gonadotrofinas hipofisárias. As taxas médias de clivagem, bem como de blastocistos e de blastocistos eclodidos (Tabela 3) não diferiram, significativamente, entre os sete grupos avaliados. A ausência de quaisquer gonadotrofinas no meio de maturação resultou em taxa de blastocisto (24%) semelhante às dos grupos contendo gonadotrofinas hipofisárias e/ou coriônicas (taxas variaram entre 22 e 31%) e o grupo contendo soro fetal bovino (SFB), FSH e LH (28%).



Tabela 3. Taxa de clivagem, blastocistos e blastocistos eclodidos dos 7 grupos experimentais do Experimento 2. Média±DP.

SFB	BSA	eCG	hCG	FSH	LH	CCOs	Clivagem	Blastocisto	Eclusão
						(n)	(%)	(%)	(%)
-	+	-	-	-	-	223	73±15	24±11	16±11
-	+	+	-	-	-	260	77±12	31±12	17±7
-	+	-	+	-	-	248	74±10	29±9	19±9
-	+	+	+	-	-	171	70±17	30±14	22±16
-	+	+	-	-	+	231	72±12	22±14	20±12
-	+	-	+	+	-	209	71±14	27±8	20±10
+	-	-	-	+	+	204	76±13	28±15	16±7

Não foram encontradas diferenças significativas

No Experimento 3, em relação à utilização do FSH e do LH no meio de MIV, na ausência de suplementação proteica, as taxas de desenvolvimento embrionário mantiveram-se semelhantes entre si (Tabela 4). O FSH e o LH sustentaram a produção de blastocistos, mesmo quando adicionados isoladamente (isto é, sem outra gonadotrofina ou fonte proteica como a albumina sérica bovina - BSA - ou o SFB) no meio de maturação.

Tabela 4. Taxa de clivagem, blastocistos e blastocistos eclodidos dos grupos experimentais na presença FSH ou LH, sem suplementação proteica (Exp. 3).

Média±DP

SFB	FSH	LH	CCOs (n)	Clivagem (%)	Blastocisto (%)	Eclosão (%)
+	+	+	128	61±14	16±11	12±11
-	+	-	142	70±9	21±12	12±9
-	-	-	114	60±10	15±7	6±5
-	-	+	89	69±14	18±9	11±5

Não foram encontradas diferenças significativas

## DISCUSSÃO

A caracterização da necessidade e da concentração ideal de gonadotrofinas coriônicas, na MIV de oócitos bovinos, ainda não havia sido adequadamente descrita na literatura. Ainda que neste trabalho não tenhamos caracterizado a concentração ideal de eCG e de hCG na MIV, houve um avanço no conhecimento deste tema.

No Experimento 1, não houve diferença estatística entre as taxas médias de clivagem (57 a 69%; 60 a 66%), de blastocisto (17 a 30%; 16 a 19%) e de eclosão (13 a 17%; 8 a 13%), respectivamente para os diferentes grupos tratados com eCG e hCG. A utilização destas gonadotrofinas - em substituição às hipofisárias, na maturação *in vitro* de oócitos bovinos - resultou em taxas de desenvolvimento embrionário semelhantes às do grupo controle (contendo FSH e LH), ainda que nas menores concentrações testadas. Taxa semelhante de clivagem

(60%) foi obtida anteriormente quando eCG e hCG foram utilizadas, em conjunto, no meio de MIV de oócitos bovinos [27]. De modo distinto, o delineamento experimental adotado permitiu a individualização do efeito de cada gonadotrofina (eCG e hCG) e de cada concentração utilizada, contrariamente de outras publicações [21, 27] em que a eCG e a hCG foram testadas de forma conjunta e em apenas uma concentração. As concentrações de 4 (eCG) e de 2 UI mL<sup>-1</sup> (hCG), que já haviam sido utilizadas conjuntamente na MIV [27], quando combinadas com gonadotrofinas hipofisárias (eCG e LH ou FSH e hCG, conforme o delineamento do Experimento 1) foram eficientes na maturação, dos oócitos bovinos, e na produção e eclosão dos blastocistos. O desenho experimental adotado, permitiu detectar que concentrações tão baixas quanto 0,015 e 0,05 UI mL<sup>-1</sup> (eCG e hCG, respectivamente) não foram deletérias para a eclosão dos blastocistos. Estas concentrações ainda não haviam sido descritas na literatura, quer em conjunto entre si quer associadas com gonadotrofinas hipofisárias.

O Experimento 2 repetiu as menores concentrações de eCG e de hCG (0,015 e 0,05 UI mL<sup>-1</sup> respectivamente) e confirmou a produção e a eclosão, de blastocistos, semelhantes àquelas do grupo controle (FSH e LH; 0,5 e 5 µg mL<sup>-1</sup> respectivamente). De modo adicional, as menores concentrações de eCG e de hCG foram capazes de sustentar a produção e eclosão dos embriões, quer isoladamente quer em associação entre si. Não há nenhum trabalho descrevendo o uso destas gonadotrofinas coriônicas, isoladas ou associadas entre si, nas concentrações utilizadas no Experimento 2.

Ainda que existam controvérsias sobre a real função do LH (ou do hCG) na MIV de oócitos bovinos, há relatos na literatura da expressão gênica e/ou da

própria proteína do receptor de LH (LHR) nos complexos *cumulus*-oócito, bem como apenas nas células do *cumulus*, no oócito e no embrião bovino [28-30]. Em ruminantes, alguns trabalhos descrevem que o LH melhorou a taxa de fertilização e a competência para o desenvolvimento embrionário de oócitos imaturos [15-16, 18, 31]. No presente trabalho, o LH foi tão efetivo quanto o FSH na MIV. No Experimento 3, as taxas de clivagem, blastocistos e blastocistos eclodidos (69, 18 e 11%, respectivamente) foram semelhantes às taxas dos grupos contendo FSH.

Recentemente, a importância da concentração e da origem do FSH, no meio de MIV, voltou a ser descrita [26]. Entretanto, ainda que uma alta concentração de FSH recombinante humano tenha sido utilizada no protocolo SPOM, a concentração ideal desse hormônio, a possibilidade de mimetizar a sua ação com a eCG, a real necessidade do LH (ou do hCG) na MIV e o sinergismo, ou não, dessas gonadotrofinas, ainda não foram adequadamente investigadas. Contrariando os resultados obtidos neste trabalho (Experimentos 2 e 3), Ali & Sirard [32] constataram que a adição de FSH recombinante, durante a MIV de oócitos bovinos em condições definidas, foi benéfica para a competência do oócito e refletiu em maiores taxas de mórulas e blastocistos produzidos *in vitro*. Em contrapartida e corroborando nossos resultados, Brackett *et al.* [15] e Zuelke & Brackett [16] demonstraram que o FSH não seria essencial para a maturação e que o LH poderia sustentar altas taxas de embriões viáveis e produzidos *in vitro*. Harper & Brackett [33] conseguiram produzir blastocistos em meio de maturação sem quaisquer gonadotrofinas, porém a taxa de clivados e blastocistos diferiu quando foi acrescentado ao meio LH, FSH ou EGF. Estes dados corroboram parcialmente o presente experimento, onde blastocistos foram produzidos em meio de maturação sem suplementação com gonadotrofinas e fonte proteica. Paradoxalmente e ao contrário destes autores [33], a taxa de

blastocistos produzidos neste grupo foi semelhante àquela obtida no grupo controle positivo (24 e 28%, respectivamente; Tabela 3).

A notória variação nas taxas de clivagem, blastocisto e eclosão, dentro e entre as replicatas de cada experimento, devido às variações fisiológicas dos animais que originaram os ovários utilizados e da influência da estação do ano na reprodução bovina [34], também foram observadas neste estudo e produziram uma grande variação nos dados obtidos. Este fato poderia explicar, em parte, a similaridade entre as taxas de blastocistos produzidos entre os grupos, com e sem FSH, do Experimento 3 (21 e 15%, respectivamente). Aparentemente, a ausência de diferença entre os grupos, quanto às taxas avaliadas (Experimentos 1, 2 e 3), não implica que não haja diferenças entre os embriões produzidos com diferentes gonadotrofinas e concentrações. Uma vez que não foram analisados parâmetros como a expressão de genes marcadores de qualidade, a taxa de gestação e de nascimento, apenas a avaliação morfológica da porcentagem de blastocistos produzidos e eclodidos deve ser tomada com cautela. No Experimento 3 (dados parcialmente não apresentados na Tabela 4), quando os grupos sem diferença estatística foram agrupados para a análise do efeito principal, ou seja, grupos sem FSH (com ou sem BSA e nenhuma outra gonadotrofina) e apenas com o FSH (com ou sem BSA), houve diferença estatística entre a taxa de eclosão ( $6,0 \pm 6,7$  e  $12,6 \pm 7,7\%$ , respectivamente;  $P=0,042$ ) e favorável ao tratamento com FSH. Porém, mesmo com a análise de efeito principal não houve diferença entre a porcentagem de blastocistos entre os grupos tratados ou não com o FSH (como única fonte de gonadotrofina).

Como observado neste estudo, a adição de gonadotrofinas ao meio de maturação pode promover efeitos benéficos para a fertilização e o desenvolvimento embrionário dos oócitos bovinos, independentemente da fonte e concentração utilizada. Entretanto, o mecanismo pelo qual esses hormônios atuam na maturação *in vitro*, simultaneamente ou separadamente, ainda necessita de estudos adicionais amplos e multicêntricos. Desse modo, a concentração e a relação ideais entre esses hormônios (FSH, LH, eCG e hCG), durante a maturação oocitária *in vitro*, permanecem indeterminadas.

## **CONCLUSÃO**

A origem, a concentração (dentre aquelas testadas) e a combinação de gonadotrofinas, utilizadas na maturação de oócitos bovinos, parece não interferir de maneira drástica na produção e na eclosão *in vitro* de embriões. Assim, nas condições deste experimento qualquer uma das gonadotrofinas utilizadas foi efetiva para promover a MIV, dos oócitos bovinos, e seu posterior desenvolvimento embrionário.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Produção *in vitro* de embriões**

A menos que mencionado, os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e Gibco (Langley, OK, USA; SFB).

### **Coleta de ovários e obtenção dos oócitos**

Os ovários de vacas aneloradas ou da raça Nelore (*Bos indicus*) foram coletados em abatedouro e transportados para o laboratório em solução salina (NaCl 0,9%), mantidos entre 33 e 35°C em garrafa térmica, durante um período máximo de 1 hora para sua posterior limpeza e lavagem (álcool 70% e solução fisiológica).

Os oócitos foram aspirados com uma agulha de calibre 18G acoplado a uma seringa de 10 mL. Folículos com diâmetro entre 3 e 8 mm foram puncionados e o fluido folicular com os complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) imaturos foram depositados em tubos cônicos estéreis de 50 mL (Corning®) e mantidos a 37°C. Após a sedimentação, os CCOs foram selecionados para a maturação *in vitro*, exceto aqueles sem células do *cumulus* (desnudos), degenerados ou com as células do *cumulus* expandidas.

### **Maturação *in vitro***

Os CCOs selecionados foram lavados três vezes em meio TCM 199 com HEPES, suplementado com 6 mg mL<sup>-1</sup> de albumina sérica bovina - BSA [33], 75 µg mL<sup>-1</sup> amicacina (Neo Química, Anápolis, GO, Brasil) e 0,2 mM piruvato. Após isso, foram lavados duas vezes no meio de maturação e distribuídos em 7 gotas (média

de 20 CCOs/gota) contendo 90  $\mu\text{L}$  deste meio e cobertas com 3,5 mL de óleo mineral em placas de Petri (Corning®) de 35 x 10 mm. O meio base para maturação consistiu de TCM-199 com bicarbonato, 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  amicacina, 0,2 mM piruvato, 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  estradiol (Sigma). Para o grupo Controle positivo (C+) este meio base foi suplementado com 10% (v/v) de SFB, 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  FSH (Folltropin®, Bioniche Animal Health, Ontário, Canadá) e 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  LH (Lutropin®, Bioniche Animal Health, Ontário, Canadá). Não foi utilizado SFB no meio de MIV dos demais grupos experimentais a fim de evitar uma eventual contaminação com gonadotrofinas séricas e hormônios esteroides e, em seu lugar, foi utilizada 6  $\text{mg mL}^{-1}$  de BSA. A concentração de gonadotrofinas hipofisárias foi a mesma para todos os grupos (LH para os grupos experimentais com eCG e o FSH para os grupos experimentais com hCG; Intervet - MSD Saúde Animal, Cruzeiro, SP, Brasil; Chorulon®5000 UI - hCG e Folligon®5000 UI - eCG) e a adição de gonadotrofinas coriônicas variou conforme os protocolos que foram utilizados para cada grupo experimental. Para os três experimentos realizados os meios foram preparados com 2 horas de antecedência e mantidos a 38,3°C em incubadora (Thermo Scientific, Forma Series II, Water Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator; Spectrum). A maturação dos CCOs foi realizada em incubadora a 38,3°C (5% CO<sub>2</sub> e umidade máxima) por um período de 22-24 horas.

#### *Experimento 1 – Definição de concentrações funcionais de eCG e hCG na MIV*

Para a determinação de concentrações funcionais e não deletérias de eCG e hCG foram utilizados dados da literatura para a espécie bovina (animal padrão 450 Kg) quanto a concentração de eCG (400 UI) e hCG (1500 UI) administrada *in vivo* para o crescimento folicular e indução da ovulação, respectivamente. À essas concentrações padrão de eCG e hCG, foram acrescidas concentrações 0,1 e 10 vezes, resultando em três concentrações de cada um dos



fármacos a serem testados (1, 10 e 100 vezes) na MIV. Duas outras concentrações de eCG (1,34 e 4,0 UI mL<sup>-1</sup>) e hCG (0,67 e 2,0 UI mL<sup>-1</sup>) utilizadas em dois diferentes protocolos encontrados na literatura [protocolo de rotina para a PIV, comunicação pessoal; 25], também foram testadas. Desse modo, foram totalizadas seis concentrações distintas para o eCG (0; 0,015; 0,15; 1,3; 1,5 e 4 UI mL<sup>-1</sup>) dando origem aos grupos experimentais (C+; E1; E2; E3; E4 e E5, respectivamente), e seis concentrações distintas para o hCG (0; 0,05; 0,5; 0,67; 2 e 5 UI mL<sup>-1</sup>), originando também seis grupos experimentais (C+; H1; H2; H3; H4 e H5, respectivamente).

#### *Experimento 2 – Gonadotrofinas hipofisárias e/ou coriônicas na MIV*

Para o Experimento 2 foram utilizadas as concentrações mínimas funcionais de eCG e hCG obtidas no experimento anterior. A partir dessas concentrações, sete grupos experimentais de MIV foram testados: meio MIV base com BSA; apenas eCG (0,015 UI mL<sup>-1</sup>); apenas hCG (0,05 UI mL<sup>-1</sup>); eCG mais hCG; eCG mais LH; hCG mais FSH; e SFB com FSH (0,5 µg mL<sup>-1</sup>) e LH (5 µg mL<sup>-1</sup>).

#### *Experimento 3 – MIV na presença FSH ou LH*

No Experimento 3 a MIV dos CCOs foi realizada em quatro grupos distintos: Controle positivo (SFB, LH e FSH); apenas FSH; apenas LH; e um último grupo somente com meio base. Neste experimento, com exceção do grupo controle positivo, os demais grupos não continham nenhuma suplementação proteica (livre de SFB e BSA).

### **Preparo do sêmen e fertilização *in vitro* (FIV)**

O sêmen criopreservado foi aquecido em água a 37°C por 1 min. Em seguida, foi depositado sobre a superfície do gradiente de Percoll com densidade descontínua (400 µL de Percoll 45% sobre 400 µL de Percoll 90%; Pharmacia Uppsala, Suécia) e centrifugado a 1530,2 g durante 6 min. O *pellet* com os espermatozoides viáveis foi removido e submetido à avaliação de motilidade e concentração, ambos sob microscopia óptica, e diluídos em volume apropriado do meio FIV para uma concentração final de  $1 \times 10^6$  espermatozoides mL<sup>-1</sup>.

Durante a centrifugação do sêmen, os CCOs maturados foram lavados três vezes em meio FIV antes de serem transferidos para as gotas de 90 µL (20 CCOs/gota) do mesmo meio, e cobertas com 3,5 mL de óleo mineral em placas de Petri de 35 mm x 10 mm.

A fertilização dos CCOs foi realizada com 5 µL de sêmen diluído por gota, durante 20-22 horas, a 38,3°C, em 5% de CO<sub>2</sub> em ar. O meio de fertilização consistiu de TALP-FIV suplementado com 6 mg mL<sup>-1</sup> de BSA, 75 µg mL<sup>-1</sup> amicacina, 0,2 mM piruvato, 3 µg mL<sup>-1</sup> heparina e 40 µL mL<sup>-1</sup> PHE.

### **Cultivo *in vitro***

Após 20 a 22 horas pós inseminação (hpi) os prováveis zigotos foram desnudados das células do *cumulus* com o auxílio de um pipetador (10-100 µL), lavados 2 vezes em meio de cultivo embrionário, transferidos para gotas de 90 µL (20 oócitos/gota) e cobertas com 3,5 mL de óleo mineral em placas de Petri de 35 mm. O meio de cultivo embrionário utilizado foi o SOF (“synthetic oviduct fluid”)

suplementado com 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  amicacina, 2 mM piruvato, 2,5% v/v SFB e 5 mg  $\text{mL}^{-1}$  BSA, a 38,3°C em 5% de  $\text{CO}_2$  e umidade máxima .

### **Avaliação do desenvolvimento embrionário**

Às 72, 168 e 240 hpi, os embriões foram avaliados com relação à clivagem, ao desenvolvimento até blastocisto e à eclosão, respectivamente, em estereomicroscópio (UNICO®). As mesmas avaliações foram feitas para os três experimentos.

### **Análise Estatística**

As médias das taxas obtidas, nas replicatas dos grupos experimentais, foram avaliadas previamente, quanto à normalidade dos dados e, subsequentemente, por ANOVA. A frequência observada referente às taxas (dados acumulados de todas as replicatas) foi avaliada por Qui-Quadrado. A significância foi considerada quando  $P \leq 0,05$ .

### **CONFLITO DE INTERESSE**

Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesse.

## **CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES**

MFGN, IPE e CD elaboraram o projeto de pesquisa. MFGN e IPE forneceram o suporte estrutural, aparatos técnicos e coordenaram os experimentos. IPE e CD padronizaram a produção de embriões bovinos *in vitro* no Laboratório de Micromanipulação Embrionária, localizado na UNESP/Assis. CD realizou os experimentos 1 e 2 com o auxílio de EMP. MFM realizou o Exp. 3 com o auxílio de CD e EMP. Todos os autores participaram da elaboração e revisão do manuscrito, logo estão cientes e aprovam a versão final do mesmo.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a CAPES e a FAPESP pelo suporte financeiro do projeto e das bolsas concedidas; a Raquel Z. Puelker pelo preparo de alguns meios de cultivo utilizados durante o experimento; ao amigo Eduardo M. Razza pelo auxílio e tradução do artigo; a todos do Laboratório de Micromanipulação Embrionária pela ajuda durante as rotinas de punções foliculares; e um especial agradecimento ao Frigorífico FRIBOM/Assis-SP/Brasil, a Dra. Michele Honório, ao Sr. Osvaldo R. da Fonseca e ao Sr. Valdemir de Jesus, que forneceram os ovários utilizados neste experimento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA: **Normal development following *in vitro* fertilization in cow.** *Biol. Reprod.* 1982, **27**:147-158.
2. Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T: **Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle.** *Theriogenology*, 1997, **47**: 23-32.
3. Bevers MM, Dieleman SJ, van den Hurk R, Izadyar F: **Regulation and modulation of oocytes maturation in the bovine.** *Theriogenology*. 1997, **47**:13-22.
4. van den Hurk R, Zhao J: **Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles.** *Theriogenology*. 2005, **63**: 1717-1751.
5. Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP: **Oocytes and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns.** *Reproduction Domestic Animal*. 2003, **38**:259-267.
6. Eppig JJ, O'Brien MJ, Wigglesworth K, Nicholson A, Zhang W, King BA: **Effect of *in vitro* maturation of mouse oocytes on the health and lifespan of adult offspring.** *Hum. Reprod.* 2009, **24**:922–928.
7. Gilchrist RB: **Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to *in vitro* maturation.** *Reprod. Fertil. Develop.* 2011, **23**:23-31.
8. Takagi M, Choi YH, Kamishita H, Acosta TJ, Wijayagunawardane MP, 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*. 1998, **51**:195-203.

9. Pincus G, Enzmann EV: **The comparative behavior on mammalian eggs *in vivo* and *in vitro***. *J. Exp. Med.* 1935, **62**: 665-675.
10. Guixue Z, Luciano AM, Coenen K, Gandolfi F, Sirard MA: **The influence of cAMP before or during oocyte maturation on embryonic developmental competence**. *Theriogenology*. 2001, **55**:1733-1743.
11. Sanbuissho A, Threlfall WR: **The influence of serum and gonadotropins on MIV and fertilization of bovine oocytes**. *Theriogenology*. 1990, **34**:341-348.
12. Brackett BG, Zuelke KA: **Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos**. *Theriogenology*. 1993, **39**:43-64.
13. Fukushima M, Fukui Y: **Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability extrafollicular bovine oocytes cultured *in vitro***. *Anim. Reprod. Sci.* 1985, **9**:323-332.
14. Fukui Y, Ono H: **Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in-vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes**. *J. Reprod. Fert.* 1989, **86**:501-506.
15. Brackett BG, Younis AI, Fayrer-Hosken RA: **Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentrations of luteinizing hormone**. *Fertil. Steril.* 1989, **52**:319-324.
16. Zuelke K, Brackett BG: **Luteinizing Hormone-Enhanced *In Vitro* Maturation of Bovine Oocytes with and without Protein Supplementation**. *Biology of Reproduction*. 1990, **43**:784-787.
17. Choi YH, Carnevale EM, Seidel GE, Squires EL: **Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199**. *Theriogenology* 2001, **56**:661-670.

18. Zuelke KA, Brackett BG: **Increased glutamine metabolism in bovine cumulus cell-enclosed and denuded oocytes after *in vitro* maturation with luteinizing hormone.** *Biology of Reproduction.* 1993, **48**: 815-820.
19. Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge ML, First NL: ***In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured in Serum-Free Medium.** *Biology of Reproduction.* 1991, **44**:256-260.
20. Coelho LA, Esper CR, Garcia JM, Vantini R, Silva Filho IR, Almeida Jr IL: **Avaliação das condições de maturação oocitária e do efeito de reprodutor na produção *in vitro* de embriões bovinos.** *Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.* 1998, **35**:120-122.
21. Coelho LA, Esper CR, Alvarez RH, Vantini R, Almeida Jr IL: **Produção *In Vitro* de Embriões Bovinos: Utilização de Diferentes Fontes de Gonadotrofinas na Maturação dos Oócitos.** *R. Bras. Zootec.* 2002, **31**:1117-1121.
22. Avery B, Brandenhóff HR, Greve T: **Development of *in vitro* matured and fertilized bovine embryos, cultured from days 1-5 post insemination in either menez-B2 medium or in HECM-6 medium.** *Theriogenology.* 1995, **44**:935-945.
23. Gordon I: *Laboratory production of cattle embryos.* 2<sup>nd</sup> Edition, 2003. Cambridge: CABI Publishing.
24. Gonçalves PBD, Visintin JA, Oliveira MAL, Montagner MM, Costa LFS: **Produção *in vitro* de embriões.** In: *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal.* 2002, **10**:195-226.

25. Sha W, Xu BZ, Li M, Liu D, Feng HL, Sun QY: **Effect of gonadotropins on oocyte maturation *in vitro*: an animal model.** *Fert. Steril.* 2010, **93**:1650-1661.
26. Albus FK, Sasseville M, Lane M, Armstrong DT, Thompson JG, Gilchrist RB: **Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes.** *Human Reproduction.* 2010, **25**:2999-3011.
27. Ocaña Quero JM, Millan MM, Merlin MP, Mariscal MAO, Franganillo AR: ***In vitro* bovine embryos production: influence of serum and hormonal supplementation.** *Arch. Zootec.* 1999, **48**:71-74.
28. Calder MD, Caveney AN, Smith LC, Watson AJ: **Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation *in vitro*.** *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2003, **1**:1-14.
29. Calder MD, Caveney AN, Sirard MA, Watson AJ: **Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation *in vitro*.** *Fertility and Sterility.* 2005, **83**:1077-1085.
30. Mishra S, Lei ZM, Rao CV: **A Novel Role of Luteinizing Hormone in the Embryo Development in Cocultures.** *Biology of Reproduction.* 2003, **68**:1455-1462.
31. Dominko T, First NL: **Timing of Meiotic Progression in Bovine Oocytes and Its Effect on Early Embryo Development.** *Molecular Reproduction and Development.* 1997, **47**:456-467.



32. Ali A, Sirard MA: **Effect of the Absence or Presence of Various Protein Supplements on Further Development of Bovine Oocytes During *In Vitro* Maturation.** *Biol. Reprod.* 2002, **66**:901-905.
33. Harper KM, Brackett BG: **Bovine Blastocyst Development after *In vitro* Maturation in a Defined Medium with Epidermal Growth Factor and Low Concentrations of Gonadotropins.** *Biology of Reproduction.* 1993, **48**:409-416.
34. Al-Katanani YM, Paula-Lopes FF, Hansen PJ: **Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows.** *J Dairy Sci.* 2002, **85**:390-396.
35. Mingoti GZ, Castro VSDC, Méo SC, Barretto LSS, Garcia JM: **The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine *in vitro* procedures on kinetics of maturation and embryo development.** *In Vitro Cell.Dev.Biol.* 2011, **47**:361-367.

*Considerações finais*

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hipótese de que os oócitos bovinos submetidos ao processo de MIV em meio suplementado com hormônios hipofisários e/ou coriônicos, em diferentes combinações e concentrações, podem sustentar a produção de blastocistos de maneira semelhante foi aceita nas condições do laboratório onde os experimentos foram executados.

O presente trabalho relatou que qualquer uma das gonadotrofinas utilizadas no meio de MIV pode promover efeitos benéficos para a fertilização e o desenvolvimento embrionário dos oócitos bovinos. Entretanto, estudos adicionais amplos e multicêntricos podem contribuir para descobrir o mecanismo pelo qual esses hormônios atuam na maturação *in vitro*, simultaneamente ou isoladamente.