

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITOS DA ADIÇÃO DO IGF-1 OU IGF-LongR3 SOBRE
ASPECTOS CELULARES E MOLECULARES DE
COMPLEXOS *CUMULUS*-OÓCITO DURANTE A
MATURAÇÃO OOCITÁRIA *IN VITRO* EM BOVINOS

MICHELLE SILVA ARAUJO

Botucatu – SP
Abril/2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITOS DA ADIÇÃO DO IGF-1 OU IGF-LongR3 SOBRE
ASPECTOS CELULARES E MOLECULARES DE
COMPLEXOS *CUMULUS*-OÓCITO DURANTE A
MATURAÇÃO OOCITÁRIA *IN VITRO* EM BOVINOS

MICHELLE SILVA ARAUJO

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Animal, para obtenção do
título de Mestre.

Orientadora: Profª Drª Fernanda da Cruz
Landim-Alvarenga.
Coorientador: Prof. Dr. Anthony César de
Souza Castilho.

Botucatu – SP
Abril/2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Araujo, Michelle Silva.

Efeitos da adição do IGF-1 ou IGF-LongR3 sobre aspectos celulares e moleculares de complexos *cumulus*-oócito durante a maturação oocitária *in vitro* em bovinos / Michelle Silva Araujo. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga

Coorientador: Anthony César de Souza Castilho

Capes: 50504002

1. Oócitos. 2. Fertilização *in vitro*. 3. Expressão gênica. 4. Substâncias de crescimento. 5. Técnicas de maturação *in vitro* de oócitos. 6. Bovino - Reprodução.

Palavras-chave: expressão gênica; fator de crescimento semelhante à insulina; fertilização *in vitro*; oócito.

Nome do Autor: Michelle Silva Araujo.

Título: EFEITOS DA ADIÇÃO DO IGF-1 OU IGF-LongR3 SOBRE ASPECTOS CELULARES E MOLECULARES DE COMPLEXOS *CUMULUS*-OÓCITO DURANTE A MATURAÇÃO OOCITÁRIA *IN VITRO* EM BOVINOS.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Drª Mariana Fernandes Machado

Pós-Doutoranda

Departamento de Farmacologia

IBB – UNESP - Botucatu

Profª Drª Ester Siqueira Caixeta

Doutora

Departamento de Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento

Instituto de Ciências Biomédicas – UNIFAL - Alfenas

Data da defesa: 30 de Abril de 2015.

“Cansados da eterna luta por abrir um caminho pela matéria bruta, escolhemos outro caminho e nos lançamos, apressados, aos braços do infinito. Mergulhamos em nós mesmos e criamos um novo mundo.”

Henrik Steffens

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar dedico este trabalho a **Deus**, pois sem Ele nada seria possível.

Ao meu filho, **João Pedro Silva Bernardes**, por ser a minha força motivadora que nunca me deixa desistir. Você é o anjinho que Deus colocou na minha vida.

Ao meu noivo e futuro marido **Rodrigo Volpato**, por todo carinho, paciência e força que você me proporcionou durante todo esse período de grandes transformações. Não foram momentos fáceis, mas imprescindíveis para nos aproximarmos ainda mais. Tenho certeza de que juntos vamos construir uma família linda e unida.

Aos meus pais, **Emília Maria Silva Ribeiro Curi** e **Francisco de Assis Araújo**, por todo amor e apoio indispensáveis para que eu pudesse chegar até aqui. Mãe, você é demais!!!

Ao meu pai de coração que Deus me presenteou, **Luiz Roberto Lisa Curi**, por toda preocupação, amor, boas risadas e grandes ensinamentos transmitidos. Você é meu ídolo!!!

À minha querida vó **Enide**, a qual tem sido um grande exemplo de força e superação, enfrentando com muita garra esse momento tão difícil. Todos os dias penso em você e torço pela sua melhora.

Aos meus quatro irmãos **Bruno**, **Juliana**, **Rodrigo** e **Rafa**; grandes guerreiros e motivo de muito orgulho. Estamos cada um em um cantinho do Brasil conquistando nossos sonhos, mas unidos pelos pensamentos e coração. Em especial ao grande neurocientista da família, **Bruno Henrique Silva Araujo Torres**, por todas as conquistas que tem feito atualmente. Você está se tornando um grande pesquisador e ainda tenho muito a aprender com você. Amo-te muito e tenho muito orgulho de você irmão! Nossa caminhada está apenas começando...

Ao **Jim**, o mascote da família, que infelizmente nos deixou depois de tantos anos bem vividos. Só tenho a agradecê-lo por ter cuidado tão bem do Rodrigo e por ter nos protegido por este curto período de tempo que moramos juntos. Não tenho dúvidas de que viveu pouco, pois já nasceu sabendo o verdadeiro significado do amor. Vamos nos reencontrar na ponte do arco-íris...

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para a execução deste trabalho. Primeiramente aos professores e doutores **Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga** e **Anthony César de Sousa Castilho** por toda orientação, apoio e ensinamentos transmitidos. Em especial à professora **Fernanda**, por quem possuo profunda admiração pela dedicação, trabalho, paciência e compreensão.

Ao meu noivo **Rodrigo Volpato**, por sempre se preocupar comigo, me acompanhar durante as várias idas aos frigoríficos e por ser um paizão para o JP e cuidar tão bem dele nos meus momentos de ausência.

Ao meu filho **João Pedro Silva Bernardes**, por me fazer rir com a sua carinha de besouro até nos momentos mais difíceis.

Às queridas amigas **Midyan Daroz Guastali** e **Marianne Camargos Dias** por toda ajuda e companheirismo durante a coleta e aspiração dos ovários. “**Mids**”, não tenho palavras para agradecer todo o apoio que você me proporcionou durante esse período de mestrado! Você é uma pessoa muito querida e especial pra mim! Você e a Mari foram indispensáveis para a realização deste trabalho!

À **Patrícia Fontes** por sempre me receber tão bem e pelo auxílio na execução dos PCR's.

À **Mariana Fernandes Machado** e **Débora Jardina**, pessoas de enorme coração, que me ensinaram a manipular e a preparar os oócitos para as técnicas de TUNEL e PCR. Vocês são muito queridas!!!

A **todos os colegas** do Laboratório de Terapia Celular e Reprodução Avançada (LANÇA) e aos **funcionários** do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da UNESP de Botucatu.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo auxílio financeiro e concessão da bolsa de mestrado.

Muito obrigada!!

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figure 1. Oocytes stained with Hoechst 33342 viewed in an epifluorescence microscope and classified into metaphase 1 stage for presenting only one fluorescent genetic material (red arrow) or metaphase 2 stage, when presenting two fluorescent genetic materials (white arrows).....39

Figure 2. Oocytes viewed with an epifluorescence microscope after TUNEL assay and classified as TUNEL-negative oocyte (A), metaphase 1 TUNEL-positive oocyte with a single fluorescent genetic material (red arrow) (B) and metaphase 2 TUNEL-positive oocyte with two fluorescent genetic material (white arrow) (C).....40

Figure 3. Relative abundance (mean $\pm$ S.E.M.) of *AREG*, *EGFR*, *FSHR*, *COX2*, *BAX*, *BCL2*, *IGFBP2*, *IGFBP4*, and *IGFBP5* mRNA in bovine *cumulus* cells after 22-24 hours of IVM. Data were obtained after five replicates of IVM for each treatment (n = 20 COCs/eplicate). Bars with different letters indicate statistical difference ($P \leq 0.05$).....45

Figure 4. Relative abundance (mean $\pm$ S.E.M.) of *GDF9*, *BMP15*, *BAX*, *BCL2*, *OOSP1*, *IGFBP2*, *IGFBP4*, and *IGFBP5* mRNA in bovine oocytes after 22-24 hours of IVM. Data were obtained after five replicates of IVM for each treatment (n = 20 COCs/replicate). Bars with different letters indicate statistical difference ($P \leq 0.05$).....46

LISTA DE GRÁFICOS

Capítulo 2

Graph 1. Percentage of metaphase 2 stage oocytes without apoptosis for each experimental groups.....43

Graph 2. Percentage of metaphase 1 stage oocytes with and without apoptosis or metaphase 2 stage with apoptose for each experimental groups after TUNEL and Hoechst 33342 staining techniques at the end of five replicates of IVM.....43

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Table 1. Amount of oocytes in metaphase 1 stage with and without apoptosis or metaphase 2 with apoptosis and metaphase 2 without apoptosis, after performing TUNEL and Hoechst 33342 staining techniques for each experimental group compared to LongR3-IGF-1 group at the end of five replicates of IVM.....42

LISTA DE ABREVIATURAS

Capítulo 1

AREG = ampiregulina
BAX = BCL-2 associada à proteína X
BCL-2 = célula de linfoma B – proteína 2
BMP-15 = proteína morfogênica óssea 15
BTC = betacelulina
CCOs = complexos *cumulus*-oócito
COX-2 = ciclooxigenase 2
DNA = ácido desoxirribonucleico
EGF = fator de crescimento epidermal
EGFR = receptor do fator de crescimento epidermal
FIV = fertilização *in vitro*
FSH = hormônio folículo estimulante
FSHR = receptor do hormônio folículo estimulante
GDF-9 = fator de crescimento e diferenciação-9
GH = hormônio do crescimento
IGF = fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP = proteína de ligação aos fatores de crescimento semelhantes à insulina
IGF-LongR3 = fator de crescimento semelhante à insulina-1 recombinante-3
IGFR = receptor de IGF
LH = hormônio luteinizante
MIV = maturação *in vitro*
mRNA = ácido ribonucleico mensageiro

Capítulo 2

AREG = ampiregulina
BAX = BCL-2 associada à proteína X
BCL-2 = célula de linfoma B – proteína 2
BMP-15 = proteína morfogênica óssea 15

CCOs = complexos *cumulus*-oócito

COX-2 = ciclooxigenase 2

DMPBS = dullbecco modificado flush

DNA = ácido desoxirribonucleico

EDTA = ácido etileno diamino tetracético

EGF = fator de crescimento epidermal

EGFR = receptor do fator de crescimento epidermal

FIV = fertilização *in vitro*

FSH = hormônio folículo estimulante

FSHR = receptor do hormônio folículo estimulante

GAPDH = gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GDF-9 = fator de crescimento e diferenciação-9

GH = hormônio do crescimento

H2FAZ = membro da família da histona H2A Z

IGF = fator de crescimento semelhante à insulina

IGFBP = proteína de ligação aos fatores de crescimento semelhantes à insulina

IGF-LongR3 = fator de crescimento semelhante à insulina-1 recombinante-3

IGFR = receptor de IGF

LH = hormônio luteinizante

MIV = maturação *in vitro*

mRNA = ácido ribonucleico mensageiro

OOSP-1 = proteína secretada pelo oócito 1

PPIA = peptidilprolil cis-trans isomerase A

PVA = álcool polivinílico

PVP = polivinilpirrolidona

RNA = ácido ribonucléico

RT-qPCR = transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real

SFB = soro fetal bovino

TCM = tissue culture medium

TUNEL = terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	16
INTRODUÇÃO	2
OBJETIVO	4
REVISÃO DE LITERATURA	4
1. O papel dos IGFs durante a foliculogênese	4
2. O papel dos IGFs durante a maturação oocitária e apoptose	10
3. Genes relacionados à competência oocitária expressos em oócitos e células do cumulus	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
CAPÍTULO 2 – Artigo Científico	32
Abstract	33
Introduction	34
Ethical Standards	35
Material and Methods	36
Utilized products	36
Ovaries collection, oocyte aspiration and selection	37
In Vitro Maturation	37
TUNEL assay and Hoechst 33342 staining	38
Abundance quantification of mRNA in cumulus-oocyte complexes	40
Statistical Analysis	42
Results	42
Discussion	47
Acknowledgements	50
References	50
ANEXO	55
LISTA DE PRODUTOS UTILIZADOS	55

ARAUJO, M. S. *Efeitos da adição do IGF-1 ou IGF-LongR3 sobre aspectos celulares e moleculares de complexos cumulus-oócito durante a maturação oocitária in vitro em bovinos*. Botucatu, 2015. 72p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O fator de crescimento semelhante à insulina-1 recombinante-3 (IGF-LongR3), um análogo sintético do IGF-1 de maior biodisponibilidade, ainda não foi utilizado no meio de maturação *in vitro* (MIV) de complexos *cumulus*-oócito (CCOs). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar e comparar os efeitos da adição de IGF-LongR3 e do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) na MIV de CCOs bovinos, sobre a progressão meiótica, apoptose e expressão de genes nos oócitos (*GDF9*, *BMP15*, *BAX*, *BCL2*, *OOSP1*, *IGFBP2*, *IGFBP4* e *IGFBP5*) e respectivas células do *cumulus* (*AREG*, *EGFR*, *FSHR*, *COX2*, *BAX*, *BCL2*, *IGFBP2*, *IGFBP4* e *IGFBP5*). Ovários bovinos foram coletados em abatedouro, sendo selecionados 739 CCOs após aspiração de folículos de 2-8mm de diâmetro. A MIV foi realizada em meio base de maturação contendo IGF-1 (100ng/mL), IGF-LongR3 (100ng/mL), e dois grupos controles: 0,1% de álcool polivinílico (PVA) ou 10% de soro fetal bovino (SFB), durante 22-24 horas em estufa a 38,5°C e 5% de CO₂. Posteriormente os oócitos foram desnudados e preparados para a técnica de TUNEL, coloração Hoechst 33342 e RT-qPCR, intencionando-se avaliar a apoptose, maturação nuclear e a expressão gênica, respectivamente. A análise estatística foi realizada por um modelo linear de efeitos mistos, o qual relacionou a mudança de estágio de metáfase 1 para metáfase 2 e a ausência de apoptose entre os grupos experimentais, pelo programa lmer4. Os testes ANOVA e Tukey foram utilizados para análise dos resultados obtidos pelo RT-qPCR. Ao final de dez réplicas de MIV foram avaliados 339 (n= 5 réplicas) oócitos quanto à progressão meiótica e apoptose e 400 (n= 5 réplicas) quanto à expressão gênica. Não foi observada diferença significativa ($P<0,05$) entre os grupos experimentais com relação à progressão meiótica e apoptose. Foi possível detectar a expressão de mRNA para todos os genes avaliados nos oócitos e respectivas células do *cumulus* em todos os grupos experimentais. Houve diferença estatística ($P\leq 0,05$) entre o grupo 10% de SFB e os grupos IGF-1 e IGF-LongR3 para a expressão do gene *IGFBP4* nas células do

cumulus. A expressão do gene *COX2* também foi estatisticamente diferente entre o grupo 0,1% de PVA e os grupos IGF-1 e IGF-LongR3. Houve diferença estatística para a expressão do gene *BCL2* nos oócitos entre os grupos IGF-1, 10% de SFB e 0,1% de PVA e para a expressão do gene *IGFBP4* entre os grupos IGF-LongR3, 0,1% de PVA e 10% de SFB. Não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais para os demais genes avaliados nos oócitos e células do *cumulus*. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que é possível realizar a MIV de oócitos bovinos na presença do IGF-LongR3, possibilitando sua utilização em substituição ao IGF-1 e ao SFB.

Palavras-chave: Oócito, fertilização *in vitro*, fator de crescimento semelhante à insulina, expressão gênica.

ARAUJO, M. S. *Addition effects of IGF-1 or LongR3-IGF-1 on cellular and molecular aspects of cumulus-oocyte complexes during in vitro oocyte maturation in cattle*. Botucatu, 2015. 72p. Dissertation (Master's Degree) – College of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, State University of São Paulo.

ABSTRACT

The insuline like growth factor-1 recombinant-3 (LongR3-IGF-1) a synthetic analogue of IGF-1 with greater bioavailability has not yet been used in *in vitro* maturation medium of *cumulus*-oocyte complexes (COCs). Therefore the aim of this study was to evaluate and compare the effects of LongR3-IGF-1 and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) addition in the IVM of bovine oocytes on meiotic progression, apoptosis, and genic expression COCs (*GDF9*, *BMP15*, *BAX*, *BCL2*, *OOSP1*, *IGFBP2*, *IGBFP4* e *IGFBP5*) and their respectively *cumulus* cells (*AREG*, *EGFR*, *FSHR*, *COX2*, *BAX*, *BCL2*, *IGFBP2*, *IGFBP4* e *IGFBP5*). Bovine ovaries were collected in slaughterhouse being selected 739 oocytes after aspiration of follicles from 2-8mm diameter. *In vitro* maturation (IVM) was performed on basic maturation medium containing IGF-1 (100 ng/ml), LongR3-IGF-1 (100ng/ml), and two control groups: 0.1% polyvinyl alcohol (PVA) or 10% fetal bovine serum (FBS), for 22-24 hours in an incubator at 38.5°C and 5% CO₂. Subsequently oocytes were denuded and prepared for TUNEL technique, staining Hoechst 33342 and RT-qPCR, intending to evaluate apoptosis, nuclear maturation and gene expression, respectively. Statistical analysis was performed using a linear mixed effects model, which correlated the change in metaphase stage 1 to 2 and the absence of apoptosis among the experimental groups. ANOVA and Tukey tests were used to analyze the results obtained by RT-qPCR. After ten replicas of IVM, 339 oocytes (n=5 pools) were evaluated for meiotic progression and apoptosis and 400 (n=5 pools) for gene expression. There was no statistical difference ($P>0,05$) between the experimental groups with respect to meiotic progression and apoptosis. It was possible to detect mRNA expression of all evaluated genes in the oocyte and its *cumulus* cells in all experimental groups. There was statistical difference between the group 10% FBS and IGF-1 and LongR3-IGF-1 groups for the expression of gene *IGFBP4* in *cumulus* cells. The expression of *COX2* gene was also statistically different ($P\leq 0,05$) between 0.1% PVA group and IGF-1 and LongR3-IGF-1 groups. Statistical difference was found for the expression of

BCL2 gene in oocytes between IGF-1 groups, 10% FBS and 0.1% PVA and for the expression of *IGFBP4* gene between LongR3-IGF-1, 0.1% PVA and 10% FBS groups. There was no statistical difference between the experimental groups for other genes evaluated in oocytes and *cumulus* cells. The results obtained of this study show that is possible to perform IVM of bovine oocytes in the presence of LongR3-IGF-1, allowing its use in replacement of IGF-1 and FBS.

Key-words: Oocyte, *in vitro* fertilization, insuline-like growth factor, genic expression.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é um dos países que mais produz e utiliza a tecnologia de fertilização *in vitro* (FIV) no mundo. No ano de 2012 o país produziu 349.171 embriões *in vitro* de um total de 355.205 embriões produzidos na América do Sul, representada pela Argentina, Brasil e Panamá, a partir de oócitos adquiridos pela técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (“ovum pick-up”). A indústria brasileira de produção *in vitro* (PIV) de embriões está crescendo, operando atualmente em vários outros países da América do Sul, África do Sul e mais recentemente na Rússia (PERRY, 2013; HASLER, 2014).

No entanto, apesar de 80% dos oócitos maturados *in vitro* serem fertilizados com sucesso, apenas 30 a 40% de blastocistos desenvolvidos são obtidos após a maturação *in vitro* (MIV), fertilização e cultivo dos embriões (MERMILLOD et al., 1999; SIRARD et al., 2006). Acredita-se que estes resultados se devem principalmente ao baixo potencial de desenvolvimento da competência dos oócitos destinados à PIV (WATSON, 2007). Assim, as tecnologias reprodutivas assistidas tais como a FIV, transferência de embriões, transgenia e clonagem, ainda tem um impacto limitante devido à falta de oócitos aptos à fertilização (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; DE BEM et al., 2014).

Na tentativa de aumentar a eficiência do desenvolvimento de oócitos cultivados *in vitro*, pesquisas tem focado a adição de substâncias promotoras de crescimento aos meios de maturação, e na simulação de forma fidedigna das condições intrafoliculares (GOTTARDI; MINGOTI, 2009). Dentre as substâncias promotoras do crescimento, destaca-se a família dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), composta pelos ligantes IGF-1 e IGF-2, os quais são polipeptídeos estruturalmente relacionados à pró-insulina (JONES; CLEMMONS, 1995; KANE et al., 1997). O IGF-1 parece ser de grande importância para a função oocitária, uma vez que seus receptores estão presentes nos complexos *cumulus*-oócito (CCOs), e grande quantidade desse fator é particularmente produzida pelas células do *cumulus* (ZHOU et al., 2000; NUTTINCK et al., 2004). Além disso, componentes do sistema IGF expressos em oócitos participam acelerando o processo de maturação nuclear, favorecendo a competência oocitária (SAKAGUCHI et al., 2002; WALTERS et al., 2006).

O fator de crescimento semelhante à insulina-1 recombinante-3 (IGF-LongR3) é um análogo sintético do IGF-1 com habilidade de se ligar ao seu receptor com maior biodisponibilidade (PRELLE et al., 2001; PAMPUSCH et al., 2005). Desta forma, o IGF-LongR3 tem sido amplamente utilizado em sistemas de cultivo de folículos e células da granulosa (GUTIERREZ et al., 2000; THOMAS, F. et al., 2007). Embora a adição do IGF-LongR3 ao meio de maturação de oócitos bovinos não tenha sido realizada até o presente momento, a ação deste hormônio sobre a produção de embriões *in vitro* nesta espécie já foi avaliada. A adição de 100ng/ml de IGF-LongR3 ao meio de cultivo de embriões bovinos estimulou o desenvolvimento embrionário inicial e aumentou o número de células nos blastocistos (PRELLE et al., 2001).

Rotineiramente, a qualidade dos oócitos é avaliada imediatamente após a sua coleta, sendo restrita apenas à avaliação visual não invasiva da morfologia dos CCOs, que inclui a homogeneidade do citoplasma e o número de camadas de células do *cumulus* compactas ao redor do oócito. Esta avaliação permite eliminar oócitos nos quais a maturação já foi iniciada *in vivo*, ou aqueles que apresentam sinais de atresia tanto no seu citoplasma quanto nas suas células do *cumulus*. Porém, estudos recentes tem demonstrado que análises mais acuradas em nível celular e molecular podem representar um critério novo e mais objetivo para acessar a qualidade oocitária (ALBERTINI et al., 2003; NICHOLAS et al., 2005).

Sabe-se que os oócitos de mamíferos precisam acumular todos os fatores maternos necessários durante a foliculogênese para se prepararem para os eventos que vão ocorrer após a fertilização (LEQUARRE et al., 2005; SONG; WESSEL, 2005). Portanto, a competência oocitária pode estar relacionada à grande quantidade de transcritos específicos presentes no “pool” de RNA mensageiro (mRNA) que é acumulada durante o crescimento do oócito e na fase final da foliculogênese (SIRARD et al., 2006; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012). Sendo assim, diferenças entre oócitos competentes e incompetentes podem estar relacionadas com a diferença nos padrões de expressão gênica (CAIXETA et al., 2009).

Apesar de alguns genes já terem sido identificados como sendo relacionados à competência oocitária, os mecanismos envolvidos com a aquisição desta competência ainda não estão bem estabelecidos. Portanto, a ampliação dos conhecimentos sobre os aspectos celulares e moleculares é necessária para o entendimento global dos mecanismos envolvidos na competência dos oócitos, bem

como para fornecer marcadores moleculares relacionados à sua capacidade de desenvolvimento (CAIXETA et al., 2009; HUSSEIN et al., 2011).

Uma vez demonstrado que o IGF-1 durante a MIV de várias espécies animais aumentou a taxa de maturação, favoreceu a competência oocitária (SAKAGUCHI et al., 2002; QUIRK et al., 2004; KIAPEKOU et al., 2005; WALTERS et al., 2006; SIROTKIN et al., 2011) e inibiu a ocorrência de apoptose em oócitos bovinos (WASIELAK; BOGAKI, 2007), espera-se que o IGF-LongR3, quando adicionado diretamente ao meio de maturação, também aumente a taxa de oócitos em estágio de metáfase 2 após a MIV, porém de forma mais eficiente que o IGF-1; reduzindo o número de oócitos em apoptose e aumentando a expressão de genes relacionados à competência oocitária nos oócitos e nas suas respectivas células do *cumulus*. Desta forma, poderá aumentar o número de oócitos aptos à fertilização e que posteriormente completarão o seu desenvolvimento, produzindo maior número de embriões viáveis *in vitro*.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar os efeitos promovidos pela adição do IGF-LongR3 ou IGF-1 sobre a progressão meiótica, apoptose e expressão dos genes em oócitos (*GDF9*, *BMP15*, *BAX*, *BCL2*, *OOSP1*, *IGFBP2*, *IGFBP4* e *IGFBP5*) e suas respectivas células do *cumulus* (*AREG*, *EGFR*, *FSHR*, *COX2*, *BAX*, *BCL2*, *IGFBP2*, *IGFBP4* e *IGFBP5*) de CCOs bovinos, após a MIV na presença desses hormônios.

REVISÃO DE LITERATURA

1. O papel dos IGFs durante a foliculogênese

A família dos fatores de crescimento semelhantes à insulina é composta pelos polipeptídeos estruturalmente relacionados à pró-insulina, os fatores IGF-1 e IGF-2, os quais apresentam receptores específicos expressos na superfície celular (IGFR-1

e IGFR-2) e seis proteínas de ligação aos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5, -6) (JONES; CLEMMONS, 1995; KANE et al., 1997; NUTTINCK et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2012). Estes fatores atuam sobre o metabolismo intermediário, o crescimento, a proliferação e a diferenciação celular (JONES; CLEMMONS, 1995).

O IGF-LongR3 é um análogo sintético do IGF-1, o qual possui menor afinidade em se ligar às IGFBPs, sendo amplamente utilizado em cultivos de folículos e de células da granulosa (FRANCIS et al., 1992; THOMAS, et al., 2007). É estruturalmente composto de uma sequência de aminoácidos que compõem o IGF-1, com substituição da glicina ou da arginina pela glutamina na posição 3, apresentando 13 aminoácidos na porção N-terminal. Esta modificação reduz a ligação deste IGF às IGFBPs, permitindo o aumento da concentração de IGF livre disponível para se ligar aos seus receptores celulares (FRANCIS et al., 1992).

O fígado é o órgão responsável pela maior produção de IGF-1 do organismo, exercendo a função de hormônio endócrino. Sua produção é estimulada pelo hormônio do crescimento (GH), e sua secreção é concomitantemente à sua produção, uma vez que não há um órgão de armazenamento específico. Na espécie bovina, o IGF-1 endócrino está associado a vários eventos reprodutivos, os quais compreendem a taxa de concepção ao primeiro serviço (PATTON et al., 2007), ovulações duplas (ECHTERNKAMP et al., 2004), e ao desenvolvimento embrionário antes da implantação (VELAZQUEZ et al., 2005).

O IGF-1 também pode ser sintetizado pelos tecidos-alvos como ovários, tubas uterinas, útero e pelo próprio embrião, atuando, neste caso, de forma parácrina e autócrina (SPICER; ECHTERNKAMP, 1995; WATSON et al., 1999; DAFTARY; GORE, 2005; MAGALHÃES et al., 2012). O sistema parácrino/autócrino intraovariano do IGF regula o desenvolvimento folicular e a esteroidogênese, tanto sozinho quanto em sinergismo com as gonadotrofinas (GIUDICE, 1992; ARMSTRONG et al., 2002; THOMAS, et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2012).

A maioria das ações do IGF-1 e do IGF-2 é mediada pelo receptor IGFR-1. A afinidade deste receptor ao IGF-1 é um pouco maior do que ao IGF-2 e muito maior em relação à insulina. Já o receptor IGFR-2 se liga ao IGF-1 e ao IGF-2 com menos afinidade, porém não se liga à insulina (IZADYAR et al., 1998; SPICER, 2004; MAGALHÃES et al., 2012).

As IGFBPs regulam a biodisponibilidade dos IGFs, apresentando grande afinidade a estes fatores e estão presentes em todos os fluidos biológicos. Os IGFs circulam no plasma associados às IGFBPs, que são responsáveis por carregá-los até as suas células-alvo, podendo inibir ou potencializar a ação dos IGFs. A inibição da ação dos IGFs ocorre devido a sua grande afinidade de ligação às IGFBPs; porém quando estas proteínas se encontram ligadas à matriz extracelular ou quando sofrem proteólise pela proteína sérica A associada à prenhez (PAPP-A), a inibição não acontece (KANE et al., 1997; SPICER, 2004; SILVA et al., 2009).

De um modo geral, as IGFBPs desempenham quatro importantes funções na regulação das atividades dos IGFs, as quais incluem a atuação como proteínas de transporte no plasma, prolongam a meia-vida dos IGFs por meio da regulação de sua depuração metabólica, proporcionam um meio de ligação a tecidos ou a células específicas, e modulam diretamente a interação dos IGFs com seus receptores, controlando indiretamente a sua biorreatividade (SILVA et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2012). As IGFBPs são de grande importância para a regulação do desenvolvimento folicular, uma vez que seus níveis se alteram com o decorrer da foliculogênese, modulando a ação dos IGFs e, conseqüentemente, as ações das gonadotrofinas (MONGET et al., 1989). Quatro dentre os seis tipos de IGFBPs (IGFBP-2, -3, -4 e -5) foram identificadas no fluido folicular de bovinos. (BAXTER, 2000; MIHM et al., 2000; MONGET et al., 2002).

O desenvolvimento folicular ovariano é regulado por mecanismos endócrinos, autócrinos e parácrinos que coordenam a proliferação e diferenciação das células somáticas. Os fatores de crescimento, peptídeos e hormônios estão intimamente relacionados a estes mecanismos de desenvolvimento e diferenciação folicular, embora as exigências foliculares para cada uma das fases da foliculogênese sejam diferentes quanto à substância requerida e às concentrações necessárias (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; MAGALHÃES et al., 2012). Estudos *in vitro* com células da granulosa de bovinos indicaram que o IGF-1 aumentou a sensibilidade ao hormônio folículo estimulante (FSH), e estimulou a produção de estradiol, progesterona, androstenediona, ativina-A, inibina-A e folistatina (GLISTER et al., 2001).

O IGF-1 e outros fatores de crescimento tem sido relacionados a vários processos que acontecem em diferentes estádios do desenvolvimento folicular, da maturação oocitária (DEMEESTERE et al., 2004) e do subsequente desenvolvimento embrionário em várias espécies, incluindo os bovinos (PALMA et

al., 1997), suínos (SIROTKIN et al., 2011), coelhos (HERRLER, et al., 1998), camundongos (SIROTKIN et al., 2000) e humanos (LIGHTEN et al., 1998).

O papel exato dos IGFs na regulação do desenvolvimento oocitário durante a foliculogênese inicial ainda não está elucidado (THOMAS et al., 2007). Durante a fase pré-antral, apesar dos folículos serem responsivos às gonadotrofinas, os maiores responsáveis pela regulação da foliculogênese são os fatores intraovarianos. Durante esta fase na espécie bovina, os IGFs apresentam ação endócrina, uma vez que os folículos pré-antrais expressam apenas o *IGFR1* e a *IGFBP2* nas células da granulosa, a *IGFBP3* nos oócitos, mas não expressam o mRNA para os IGFs ligantes (*IGF1* e *IGF2*) (GONG et al., 1996; ARMSTRONG et al., 2000; ARMSTRONG et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2012). No entanto, a presença do mRNA codificador *IGF1* nas células da granulosa em bovinos parece ser controversa, com estudos demonstrando sua presença (SPICER et al., 1993; SPICER; ECHTERNKAMP et al., 1995; SCHAMS et al., 2002), enquanto outros demonstraram sua ausência (PERKS et al., 1999; ARMSTRONG et al., 2000; SILVA et al., 2009).

Embora Gutierrez et al. (2000) tenham relatado um estímulo do crescimento folicular e oocitário até a fase de folículo antral inicial de folículos pré-antrais bovinos cultivados *in vitro* na presença de FSH, EGF e IGF-LongR3, sem prejuízo a sua morfologia, acredita-se que o IGF-1 esteja relacionado com a atresia folicular durante a fase de transição de folículos primordiais para folículos primários (SILVA et al., 2009). Segundo Armstrong et al. (2002), o sistema IGF parece não estar envolvido com o início do crescimento dos folículos primordiais bovinos, mas sim, com eventos subsequentes. Fortune et al. (2004) relataram que, em vacas, os estádios iniciais do desenvolvimento folicular são regulados, pelo menos em parte, pela concentração de IGF no microambiente do folículo. Entretanto, de acordo com Wandji et al., (1996), o IGF-1 em concentrações de 1, 10, e 100ng/ml não estimulou a transição de folículos primordiais para primários durante o cultivo de córtex ovariano bovino e aumentou a atresia folicular.

Em ensaio realizado por Thomas et al. (2007), folículos pré-antrais ($144,8 \pm 0,6 \mu\text{m}$) bovinos cultivados durante seis dias na presença do IGF-LongR3 (5ng/ml, 10ng/ml, 50ng/ml) e do IGF-1 (10ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml, 1000ng/ml), aumentaram o diâmetro folicular e a produção de estrógeno acima do observado no grupo controle para ambos os tipos de IGF. Porém, folículos tratados com IGF-

LongR3 ou com a maior concentração de IGF-1 (1000ng/ml) no meio de cultivo apresentavam uma redução na proporção do tamanho entre o oócito e o folículo, e uma alteração da morfologia do oócito, promovendo efeito negativo no desenvolvimento oocitário. Folículos tratados com doses fisiológicas de IGF-1 mantinham a proporção oócito/folículo e a qualidade oocitária como as observadas no grupo controle. O mRNA e a proteína do *IGFBP2* e *IGFBP3* foram detectadas nas células da granulosa e no oócito dos folículos pré-antrais cultivados. Assim, os autores concluíram que, uma vez que o IGF-1 e o IGF-LongR3 diferem apenas na sua afinidade às IGFBPs, a regulação da biodisponibilidade dos IGFs por estas proteínas é crucial para a coordenação do desenvolvimento oocitário e folicular inicial.

Durante o início do desenvolvimento dos folículos antrais até a fase de dominância em bovinos, o mRNA que codifica o IGF-2, o qual é o principal ligante de IGF intrafolicular nos ruminantes, foi detectado apenas nas células da teca. Em folículos pré-antrais e antrais, o mRNA que codifica o IGFR-1 esteve presente nas células da teca e da granulosa, enquanto que não foi possível detectar mRNA que codifica o IGF-1 nestas células em nenhuma das fases do desenvolvimento folicular. O IGFR-2 também está presente nas células da granulosa e da teca de folículos antrais bovinos. Em cultivo *in vitro* de células da granulosa e da teca o mRNA do IGF1 foi detectado em maior quantidade no tecido luteal, e o mRNA para o IGF-2 foi detectado tanto em células da teca, quanto em células da granulosa (ARMSTRONG et al., 2000; SCHAMS et al., 2002; SPICER; AAD, 2007). Os IGFBP-2 e -4 são produzidos pela granulosa e pela teca, respectivamente, regulando a biodisponibilidade intrafolicular de IGF durante a foliculogênese (ARMSTRONG et al., 2001).

Antes do início do desvio folicular, eventos bioquímicos intrafoliculares envolvendo o sistema IGF, o estrógeno e os receptores de LH, asseguram a futura dominância do folículo selecionado (BEG; GINTHER, 2006). As concentrações de IGF-1 livre permanecem altas e não aumentam no maior folículo em associação com o desvio folicular, mas começam a cair no segundo maior folículo antes do início do desvio, demonstrando que a queda do IGF-1 do segundo maior folículo é a maior diferença observada entre este e o folículo dominante (BEG et al., 2002). As altas concentrações de IGF-1 livre no maior folículo próximo do início do desvio folicular são temporariamente associadas à alta degradação proteolítica do IGFBP-3 e -5

pelas proteases PAPP-A. Neste momento, as concentrações de IGFBP-2, -4, e -5 são maiores no segundo maior folículo (BEG et al., 2001; RIVERA; FORTUNE, 2003). Schams et al. 2002 demonstraram que houve um relativo aumento na expressão do IGF-1 na teca interna antes da seleção folicular, enquanto após a seleção, a expressão do mRNA nas células da granulosa aumentou.

Quando a ablação do maior folículo no momento do início do desvio folicular em bovinos foi realizada, o diâmetro e as concentrações de IGF-1 livre do segundo maior folículo aumentaram após 12 horas (BEG et al., 2002). Ao injetar IGF-1 no segundo maior folículo no momento do desvio folicular, as concentrações de estradiol do fluido folicular se elevaram 6 horas após a injeção. Portanto, a ativação do sistema IGF via IGF-1 pelas proteases PAPP-A, promove a manutenção ou aumento do IGF-1 livre, do estradiol e dos receptores de LH no maior folículo antes do início do desvio folicular, sendo responsável pelo início do desvio folicular na espécie bovina. Concomitante a este mecanismo, as concentrações intrafoliculares de IGF-1 livre diminuem no segundo maior folículo (BEG; GINTHER, 2006).

Além das influências exercidas durante a foliculogênese, os IGFs atuam no tecido luteal em diferentes espécies (TALAVERA; MENON, 1991; SAUERWEIN et al., 1992; KHAN-DAWOOD et al., 1994; YUAN, et al., 1996). Os IGFs promovem efeito estimulatório sobre a produção de progesterona por meio dos IGF-1 e IGF-2, exercem influência sobre a angiogênese e sobre a apoptose na espécie bovina (AMSELGRUBER et al., 1994; CHUN et al., 1994; SCHAMS et al., 2002).

O sistema IGF é importante principalmente para o desenvolvimento inicial do corpo lúteo pela sua ação na luteinização das células foliculares e pela estimulação da ocitocina e produção de progesterona (SCHAMS, 1987; MCARDLE; HOLTORF, 1989; EINSPANIER et al., 1990). Uma vez que as proteínas de IGF-1 (AMSELGRUBER et al., 1994) e IGFR-1 (SCHAMS et al., 2002) se localizam principalmente nas células luteais grandes, a regulação parece ser ao menos em parte autócrina (SCHAMS et al., 2002). O IGF-2 foi localizado apenas na região dos fibroblastos perivasculares de grandes vasos e na periferia de capilares presentes no corpo lúteo, atuando como fator de crescimento autócrino/parácrino que afeta a proliferação e a diferenciação destes tipos celulares (AMSELGRUBER et al., 1994; SCHAMS et al., 2002). As maiores expressões de mRNA para IGF-1, IGF-2 e IGFR-1 foram observadas durante o início da fase luteal (dias 1-4), seguidas de um

decréscimo nas suas expressões, promovendo um baixo platô no corpo lúteo cíclico, mantendo-se baixas durante a gestação (SCHAMS et al., 2002).

De acordo com Schams et al. (2002), todas as seis IGFBPs foram detectadas no corpo lúteo de bovinos, porém, a expressão das IGFBP-1, -2 e -6 foram muito fracas. Sayre et al., (2000) observaram um pequeno aumento do mRNA de IGFBP-1 em vacas após a indução da luteólise pela prostaglandina. Ainda no trabalho de Schams et al. (2002), as IGFBP-3, -4 e -5 foram altamente expressas com claras mudanças nas IGFBP-3 e -4. A IGFBP-3 é a principal carreadora e armazenadora de IGFs dentro do compartimento intravascular e, provavelmente por este motivo, alta expressão de IGFBP-3 está correlacionada com maior expressão de IGF-1, IGF-2 e IGFR-1 durante o início da fase luteal (dias 1-4). Há um decréscimo na expressão da IGFBP-3 durante a metade do estágio luteal, permanecendo baixa durante a gestação. Em contraste, IGFBP-4 é significativamente mais regulada no final do período de angiogênese (dias 5-7) com tendência à queda após a regressão do corpo lúteo e durante a gestação. A IGFBP-5 demonstra uma expressão relativa constante durante todos os estádios do corpo lúteo com tendência para uma alta expressão durante os dias 3 e 4.

2. O papel dos IGFs durante a maturação oocitária e apoptose

Após a formação do antro folicular, o que corresponde ao final da fase de crescimento oocitário, as células da granulosa se diferenciam em duas distintas linhagens celulares, as células da granulosa murais, que formam a parede do folículo e são importantes para a esteroidogênese, e as células do *cumulus*, que mantêm um íntimo contato com o oócito. As células do *cumulus* possuem projeções citoplasmáticas altamente especializadas que penetram a zona pelúcida, dando origem às junções comunicantes ("gap junctions"). As junções comunicantes mantêm íntimo contato com o oócito, formando uma estrutura elaborada denominada complexo *cumulus*-oócito (ALBERTINI et al., 2001).

As células do *cumulus* norteiam o oócito durante as fases finais do seu desenvolvimento, entretanto, há um limitado conhecimento sobre a natureza e a diversidade dos componentes que são transferidos entre estes tipos celulares e o oócito, via junções comunicantes, durante o desenvolvimento antral. Não se sabe se mudanças na dinâmica desta comunicação ou na extensão da transferência de

moléculas, podem impactar a aquisição da competência do desenvolvimento do oócito (ALBERTINI et al., 2001; THOMAS et al., 2004).

Durante o crescimento do folículo antral, o oócito adquire de forma gradual e sequencial sua competência meiótica e de desenvolvimento (EPPIG, 1992; LONERGAN et al., 1994; GILCHRIST et al., 1997). É nesta fase da oogênese que o oócito adquire o maquinário molecular e celular necessários para suportar o desenvolvimento embrionário, sendo este processo denominado de capacitação oocitária (HYTTEL et al., 1997; BREVINI-GANDOLFI; GANDOLFI, 2001; SIRARD et al., 2006).

É cada vez mais evidente que o oócito é o principal mediador da função folicular, sendo essencial para a regulação da oogênese, taxa de ovulação e fertilidade (EPPIG, 2001; GILCHRIST et al., 2004; MCNATTY et al., 2004; GILCHRIST; THOMPSON, 2007). Os fatores de crescimento solúveis secretados pelo oócito atuam na vizinhança dos folículos regulando várias funções das células da granulosa e das células do *cumulus*. Desta forma, há um eixo de comunicação entre os oócitos e suas células somáticas, com moléculas específicas sendo secretadas pelo oócito, que formam a base deste eixo de comunicação (GILCHRIST et al., 2008).

Um dos fatores que forma o eixo de comunicação entre o oócito e suas células do *cumulus* é o IGF. Vários estudos foram realizados para investigar a expressão do sistema IGF na parede folicular em bovinos, porém poucos foram realizados em CCOs (NUTTINCK et al., 2004). A presença do IGF-1 no meio de maturação promove a progressão da meiose em oócitos bovinos, sugerindo que o sistema IGF folicular pode influenciar a fisiologia das células somáticas, bem como das células germinativas (SAKAGUCHI et al., 2002; NUTTINCK et al., 2004).

Nuttinck et al. (2004) detectaram a expressão de mRNA para IGF-1, IGFR-1, IGFBP-2, IGFBP-4 e FSHR em CCOs isolados de folículos antrais. Os mRNAs para IGF-1, IGFBP-4 e FSHR foram detectados nas células do *cumulus*, o mRNA para IGFR-1 e IGFBP-2 foram expressos tanto no oócito quanto nas células somáticas dos CCOs, e o mRNA para o receptor de LH não foi detectado nos CCOs. Este modelo de expressão permaneceu inalterado após a MIV, porém quando os CCOs foram cultivados na presença de 10ng/ml de EGF, a expressão da IGFBP-2 e FSHR caíram. De acordo com estes autores, uma vez que a expressão do IGF-1 ligante parece estar restrita ao compartimento somático, esta observação reforça a atuação

de forma parácrina e autócrina do IGF-1 nos CCOs. Além disso, as baixas concentrações de IGFBP-2 e FSHR podem ter levado a maior biodisponibilidade de IGF-1 no microambiente oocitário, promovendo um estímulo intrafolicular adicional para a esteroidogênese durante a fase final da diferenciação folicular. Desta forma, a regulação do IGF-1 livre pela concentração das IGFBPs no microambiente dos folículos é um parâmetro chave na influência exercida pelo sistema IGF ovariano na fisiologia folicular.

O IGF-1 parece exercer um efeito benéfico na maturação oocitária nos estágios iniciais dos folículos, ligando-se aos receptores da superfície celular muito antes da competência oocitária ser estabelecida, estimulando a maturação nuclear dos CCOs e melhorando o desenvolvimento embrionário inicial (PAWSHE et al., 1998; THOMAS, et al., 2007). Yoshida et al. (1997) detectaram transcritos de IGFR-1 durante todo o período da MIV de oócitos bovinos, enquanto os transcritos de IGF-1 foram detectados apenas em oócitos imaturos e em blastocistos após o estágio de duas células.

A morte celular programada, também denominada de apoptose, é um processo de autodestruição celular que envolve uma grande variedade de eventos biológicos (KERR et al., 1972). O trato reprodutivo feminino tem recebido considerável atenção como modelo de pesquisa para avaliar a morte celular, sendo a gônada, o órgão mais estudado neste contexto (TILLY, 1998; PEREZ et al., 1999). Entretanto, a pesquisa sobre a apoptose na função ovariana começou a mudar a partir de uma análise mais profunda da morte das células da granulosa durante o processo de atresia folicular, com o intuito de melhor compreender o papel da apoptose na degeneração das células germinativas femininas (PEREZ et al., 1999).

O estudo da apoptose e sua influência na qualidade oocitária e embrionária tem sido de grande relevância, especialmente para as tecnologias *in vitro*, as quais dispõem de uma população heterogênea de oócitos em diferentes estágios de crescimento e atresia para a produção de embriões. É possível que certos genes oocitários que controlam a apoptose sejam transferidos aos embriões, prejudicando a qualidade embrionária e o seu subsequente desenvolvimento (HANSEN, 2006; ANGUITA et al., 2007).

Estudos da literatura mostram resultados contraditórios no que diz respeito à incidência de apoptose em oócitos bovinos. Yuan et al. (2005) não detectaram apoptose em oócitos antes e após a sua maturação, enquanto Warzych et al. (2006)

e Matwee et al. (2000) observaram apoptose em oócitos maduros (11,2% e 23% respectivamente) e imaturos (1,4% e 7% respectivamente). Também há estudos que não correlacionaram o efeito negativo da MIV com a qualidade oocitária em termos de incidência de apoptose, os quais reportaram uma redução da incidência de apoptose após a maturação dos oócitos (VAN BLERKOM; DAVIS, 1998; ANGUITA et al., 2007). Esta discrepância entre os autores sobre o efeito da MIV na incidência de apoptose pode estar relacionada à diferença na composição dos meios de maturação (WARZYCH et al., 2006).

De fato, a adição de 100ng/ml de IGF-1 ao meio de MIV de oócitos bovinos, no ensaio realizado por Wasielak e Bogacki (2007), atuou como fator antiapoptótico durante a maturação, reduzindo a zero o número de oócitos em apoptose, quando avaliados pela técnica de TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP nick end labeling assay). Quando avaliados pelo método de marcação das caspases ativas, o número de oócitos em apoptose também foi menor após a MIV, porém não zero. Os autores sugeriram que a inibição da apoptose pelo IGF-1 nos oócitos acontece no estágio de ativação das caspases, bloqueando as caspases ativas, prevenindo maior avanço da apoptose e da fragmentação do DNA terminal dos oócitos.

3. Genes relacionados à competência oocitária expressos em oócitos e células do cumulus

Além da maturação nuclear e citoplasmática, os oócitos também necessitam passar por mudanças moleculares para garantir a competência para o seu completo desenvolvimento (FAIR et al., 1996; ARAUJO et al., 2014). O controle genômico materno-embriônico ocorre apenas no estágio de quatro células em embriões bovinos e, portanto, o oócito é o principal coordenador dos mRNAs e o principal responsável pelas proteínas que forem acumuladas durante a sua fase de crescimento (FAIR et al., 2007; HAMATANI, et al., 2008).

Vias distintas e variações no número de genes de oócitos bovinos maturados *in vitro* e *in vivo* tem sido observadas, podendo levar a alterações do desenvolvimento embrionário após a fertilização (KATZ-JAFFE et al., 2009; MAMO et al., 2011). Desta forma, técnicas de análise de mRNA podem ser utilizadas para identificar genes envolvidos com o processo de maturação nuclear e citoplasmático, e para identificar

locais específicos que regulam a aquisição da competência oocitária (ASSOU et al., 2006). Alguns genes expressos em oócitos e suas respectivas células do *cumulus* tais como *GDF9*, *BMP15*, *COX2*, *OOSP1*, *BAX*, *BCL2*, *EGFR*, *FSHR* e *AREG*, tem sido relacionados com o processo de aquisição da competência oocitária (NUTTINCK et al., 2002; YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002; CONTI et al., 2006; TREMBLAY et al., 2006; PAULINI; MELO, 2011; ASSIDI et al., 2013).

Dois membros da superfamília dos fatores de transformação do crescimento β (TGF β), o *GDF9* e o *BMP15*, são expressos durante todo o desenvolvimento folicular, participando da ativação dos folículos primordiais e de todos os demais estádios de desenvolvimento dos folículos, e também em oócitos (EPPIG, 2001; PAULINI; MELO, 2011). Estes fatores atuam sinergicamente e já foram identificados em oócitos bovinos, estando envolvidos com os eventos finais que ocorrem durante a maturação e a ovulação, como a expansão das células do *cumulus* (GALLOWAY et al., 2000; DRAGOVIC et al., 2007; PAULINI; MELO, 2011). Em ovinos o *GDF9* é expresso exclusivamente no oócito, enquanto que em bovinos, humanos e ratos também é expresso nos testículos (FITZPATRICK et al. 1998; SADIGHI et al., 2002; PENNETIER et al. 2004; FAURE et al. 2005; FARNWORTH et al. 2006; NICHOLLS et al. 2009; WANG et al. 2009).

Diferente do *GDF9*, a proteína *BMP15* já foi encontrada na hipófise, nos testículos e em vários outros tecidos em diferentes espécies, demonstrando que sua atividade não está restrita aos ovários (OTSUKA; SHIMASAKI, 2002). Este fator está envolvido com a manutenção da baixa incidência de apoptose nas células do *cumulus*, além de se ligar às células da granulosa, estimulando sua proliferação e modulando a expressão dos hormônios esteroides (OTSUKA; SHIMASAKI, 2002; HUSSEIN et al., 2005). Após a maturação oocitária, há um pico de expressão do *BMP15*, o qual ocorre durante a expansão das células do *cumulus* (LAN et al., 2003).

A manutenção da expressão dos níveis de *BMP15* e *GDF9* em oócitos é essencial para assegurar a fertilidade das fêmeas e para o adequado desenvolvimento folicular (LIAO et al., 2003). O *GDF9* é necessário para otimizar o microambiente oocitário, o crescimento e a atresia dos folículos ovarianos, a ovulação e a fertilização (ORISAKA et al., 2009). A ausência do *GDF9* em ratas leva ao bloqueio do desenvolvimento de folículos pré-antrais, à infertilidade e à ausência e disposição anormal das organelas do oócito (DONG et al., 1996; ELVIN et al.,

1999). Este fator também induz à expressão de outros genes nas células do *cumulus*, tais como a *COX2*, as quais são de grande importância para sua expansão durante a maturação oocitária antes da ovulação (PANGAS; MATZUK, 2005).

A expressão de mRNA e da proteína *COX2* já foram demonstradas em células da granulosa murais de folículos pré-ovulatórios e em células do *cumulus* em bovinos (LIU; SIROIS, 1998; NUTTINCK et al., 2002). Altos níveis de gonadotrofinas são responsáveis pela expressão da *COX2* nas células do *cumulus* e nas células da granulosa murais horas antes da ovulação (RICHARDS, 1997; NUTTINCK et al., 2002). Tanto na MIV quanto na maturação *in vivo* a *COX2* é expressa nos CCOs, porém o seu padrão de expressão pode se modificar conforme a condição do cultivo *in vitro* a qual os CCOs forem submetidos (NUTTINCK et al., 2002).

Além da expansão das células do *cumulus*, a *COX2* parece estar envolvida com o processo de maturação oocitária, uma vez que foi observada maior proporção de *cumulus* expandido e de oócitos em estágio de metáfase 2 após vinte e quatro horas de MIV de CCOs bovinos, os quais apresentavam maior expressão de *COX2*. Desta forma, o nível de expressão de *COX2* após a MIV de CCOs pode representar um bom marcador de melhoria das condições de maturação (NUTTINCK et al., 2002).

A família dos fatores de crescimento epidermais é composta pelo fator de crescimento epidermal (EGF) e pelos peptídeos semelhantes ao EGF, os quais são a ampiregulina (AREG), a epiregulina (EREG) e a betacelulina (BTC) (PARK et al., 2004; CONTI et al., 2006). As células da granulosa murais dos folículos ovarianos produzem e liberam estes peptídeos em resposta à onda pré-ovulatória de hormônio luteinizante (LH) (CONTI et al., 2006; SHIMADA et al., 2006; BEN-AMI et al., 2011). Desta forma, os fatores de crescimento epidermais amplificam e propagam o sinal transmitido pelo LH aos CCOs, atuando como mediadores parácrinos das ações do LH, uma vez que não foram detectados receptores de LH nas células do *cumulus* e em oócitos bovinos (PARK et al., 2004; NUTTINCK et al., 2004; SHIMADA et al., 2006; BEN-AMI et al., 2011). Em humanos, a ativação das células da granulosa murais pelo LH induz à expressão de *AREG* e *EREG*, as quais ativam os receptores de EGF nos CCOs, levando à maturação oocitária, aquisição da competência de desenvolvimento e expansão do *cumulus* (BEN-AMI et al., 2011).

O hormônio folículo estimulante (FSH) exerce várias funções em ovários de mamíferos, tais como a proliferação celular, prevenção de apoptose, produção de

estradiol e regulação da expressão de vários genes (RICHARDS, 1994; SIRARD et al., 2007; ASSIDI et al., 2013). O FSH e o EGF induzem à expressão de *AREG*, *EREG* e *BTC* pelas células do *cumulus*, desencadeando a retomada da meiose oocitária e a expansão das células do *cumulus in vitro* (GILCHRIST; THOMPSON, 2007; CAIXETA et al., 2009; RICHANI et al., 2013). Devido à limitada presença de receptores para LH nos CCOs cultivados *in vitro*, o FSH tem sido a maior gonadotrofina utilizada durante a MIV, uma vez que as células do *cumulus* possuem receptores para FSH, substituindo ao menos em parte os efeitos promovidos pelo LH, levando ao desenvolvimento da competência oocitária *in vitro* (NUTTINCK et al., 2004; SIRARD et al., 2007; ASSIDI et al., 2013). Entretanto, quando a ampiregulina, a epiregulina e a betacelulina são adicionadas isoladamente ao meio de MIV, estimulam a atividade mitocondrial de forma significativa em relação ao FSH e ao EGF, além de induzirem maior consumo de glicose em oócitos de ratas (RICHANI et al., 2014).

A apoptose ou morte celular programada é um dos principais responsáveis pela degeneração das células germinativas femininas (PEREZ et al., 1999). A apoptose pode levar à fragmentação do DNA, à degeneração oocitária e, conseqüentemente, à queda da fertilidade dos oócitos utilizados na produção de embriões *in vitro* (TAKASE et al., 1995; FUJINO et al., 1996; MATWEE et al., 2000; DE BEM et al., 2014). A análise dos genes *BAX* (pró-apoptótico) e *BCL2* (anti-apoptótico) pode ser realizada em oócitos e células do *cumulus* para avaliação da apoptose, uma vez que esses genes são de grande importância para o processo de morte celular programada de células germinativas femininas (YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002; KIM; TILLY, 2004; DE BEM et al., 2014).

Em estudo realizado por Yang e Rajamahendran (2002) foi demonstrado que oócitos e embriões de boa qualidade apresentam maior concentração de proteína *BCL2* do que a proteína *BAX*, enquanto que em oócitos de menor qualidade há maior concentração de *BAX* do que *BCL2*. A expressão da *BCL2* bloqueia especificamente as características morfológicas da apoptose, incluindo a formação de bolhas na membrana plasmática, a fragmentação do DNA e a condensação do núcleo (OLA et al., 2011). Esta proteína desempenha um papel importante na sobrevivência celular, inibindo a apoptose induzida por vários estímulos, como agentes quimioterápicos e o choque térmico (OLA et al., 2011).

A proteína *BAX* é a principal responsável pelo desenvolvimento de poros e degeneração da membrana externa das mitocôndrias celulares, o que leva à liberação dos componentes do espaço da intermembrana mitocondrial para o citoplasma (BROOKS et al., 2007). As proteínas mitocondriais liberadas ativam caspases, as quais promovem várias reações em cascata que clivam proteínas essenciais por toda a célula (WEI et al., 2001; OLA et al., 2011). A *BCL2* interage com o *BAX* impedindo a sua oligomerização e, assim, bloqueando a apoptose (YOULE; STRASSER, 2008). Em geral, a proporção relativa de proteínas antiapoptóticas (*BCL2*) e pró-apoptóticas (*BAX*) parece determinar a resistência celular ao estímulo apoptótico (OLA et al., 2011).

O gene *OOSP1* é produzido apenas nos oócitos em bovinos, no entanto, seu padrão de expressão é similar ao padrão de expressão dos genes *GDF9* e *BMP15* em oócitos e embriões. Seus níveis encontram-se aumentados durante a fase de vesícula germinativa dos oócitos e gradualmente declinam durante o estágio de blastocisto, não sendo mais detectados a partir de então (PENNETIER et al., 2004; TREMBLAY et al., 2006). Análises realizadas em ovários de ratos demonstraram que o gene *OOSP1* é especificamente expresso em oócitos primários até o estágio de folículos antrais, sugerindo uma participação deste gene no desenvolvimento folicular e oocitário (YAN et al., 2001).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTINI, D. F.; COMBELLES, C. M.; BENECHCHI, E.; CARABATSOS, M. J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*, v.121, p.647-653, 2001.
- AMSELGRUBER, W.; SINOWATZ, F.; SCHAMS, D.; SKOTTNER, A. Immunohistochemical aspects of insulin-like growth factors-I and -II in the bovine corpus luteum. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.101, p.445-451, 1994.
- ANGUITA, B.; VANDAELE, L.; MATEUSEN, B.; MAES, D.; VAN SOOM, A. Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. *Theriogenology*, v.67, p.537-549, 2007.
- ARAUJO, M. S.; GUASTALI, M. D.; VOLPATO, R.; LANDIM, F. C. Principais mecanismos envolvidos na maturação oocitária em bovinos: da oogênese à maturação in vitro. *Enciclopédia Biosfera*, v.10, n.18, p. 2373-2388, 2014.

ARMSTRONG, D. G.; GUTIERREZ, C. G.; BAXTER, G.; GLAZYRIN, A. L.; MANN, G. E.; WOAD, K. J.; HOGG, C. O.; WEBB, R. Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type I IGF receptor in bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology*, v.165, p.101–113, 2000.

ARMSTRONG, D. G.; MCEVOY, T. G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J. J.; HOGG, C. O.; WOAD, K. J.; WEBB, R.; SINCLAIR, K. D. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production *in vitro*: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biology of Reproduction*, v.64, p.1624–1632, 2001.

ARMSTRONG, D. G.; BAXTER, G.; HOGG, C. O.; WOAD, K. J. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. *Reproduction*, v.123, p.789-797, 2002.

ASSIDI, M.; RICHARD, F. J.; SIRARD, M. FSH in vitro versus LH in vivo: similar genomic effects on the cumulus. *Journal of Ovarian Research*, v.6, n.68, p. 1-13, 2013.

ASSOU, S.; ANAHORY, T.; PANTESCO, V.; LE CARROUR, T.; PELLESTOR, F.; KLEIN, B.; REYFTMANN, L.; DECHAUD, H.; DE VOS, J.; HAMAMAH, S. The human cumulus–oocyte complex gene-expression profile. *Human Reproduction*, v.21, n.7, p.1705-1719, 2006.

BAXTER, R. C. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, v.278, n.6, p.E967-E976, 2000.

BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Follicular fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biology of Reproduction*, v.64, p.432-441, 2001.

BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; KOT, K.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. *Biology of Reproduction*, v.66, p.120-126, 2002.

BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle and horses: role of introfollicular factors. *Reproduction*, v.132, n.3, p.365-377, 2006.

BEN-AMI, I.; KOMSKY, A.; BERN, O.; KASTERSTEIN, E.; KOMAROVSKY, D.; RON-EL, R. In vitro maturation of human germinal vesicle-stage oocytes: role of epidermal growth factor-like growth factors in the culture medium. *Human Reproduction*, v.26, n.1, p.76-81, 2011.

DE BEM, T. H. C.; ADONA, P. R.; BRESSAN, F. F.; MESQUITA, L. G.; CHIARATTI, M. R.; MEIRELLES, F. V.; LEAL, C. L. V. The influence of morphology, follicle size, and Bcl-2 and Bax transcripts on the developmental competence of bovine oocyte. *Reproduction in Domestic Animals*, v.49, p.576-583, 2014.

BREVINI-GANDOLFI, T. A. L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology*, v.55, p.1255–1276, 2001.

BROOKS, C.; WEI, Q.; FENG, L.; DONG, G.; TAO, Y.; MEI, L.; XIE, Z. J.; DONG, Z. Bax regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.104, p.11649–11654, 2007.

CAIXETA, E. S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M. M.; JUNIOR, J. B.; DODE, M. A. N. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocyte of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reproduction, Fertility and Development*, v.21, p.655-664, 2009.

CHUN, S. Y.; BILLIG, H.; TILLY, J. L.; FURUTA, I.; TSATIRI, A.; HSUEH, A. J. W. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor-I. *Endocrinology*, v.135, p.1845–53, 1994.

CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J. Y.; SU, Y. Q. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Molecular Endocrinology*, v.20, p.715-723, 2006.

DAFTARY, S. S.; GORE, A. C. IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. *Experimental Biology and Medicine*, v.230, p.292-306, 2005.

DEMEESTERE, I.; GERVY, C.; CENTNER, J.; DEVERKER, F.; ENGLERT, Y.; DELBAERE, A. Effect of insulin-like growth factor during preantral follicular culture on steroidogenesis, *in vitro* oocyte maturation, and embryo development in mice. *Biology of Reproduction*, v.70, p.1664-1669, 2004.

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

DRAGOVIC, R. A.; RITTER, L. J.; SCHULZ, S. J.; AMATO, F.; THOMPSON, J. G.; ARMSTRONG, D. R. T.; GILCHRIST, R. B. Oocyte-secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse cumulus cell expansion. *Biology of Reproduction*, v.76, p.848–857, 2007.

ECHTERNKAMP, S. E.; ROBERTS, A. J.; LUNSTRA, D. D.; WISE, T.; SPICER, L. J. Ovarian follicular development in cattle selected for twin ovulations and births. *Journal of Animal Science*, v.82, p.459-471, 2004.

EINSPANIER, R.; MIYAMOTO, A.; SCHAMS, D.; MULLER, M.; BREM, G. Tissue concentration, mRNA expression and stimulation of IGF-I in luteal tissue during the oestrous cycle and pregnancy of cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.90, p.439-445, 1990.

ELVIN, J. A.; CLARK, A. T.; WANG, P.; WOLFMAN, N. M.; MATZUK, M. M. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Molecular Endocrinology*, v.13, p.1035-1048, 1999.

EPPIG, J. J. Growth and development of mammalian oocytes *in vitro*. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v.116, p.379-382, 1992.

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

FAIR, T., HYTTEL, P., GREVE, T., BOLAND, M.; Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. *Molecular Reproduction and Development*, v.43, n.4, p.503-512, 1996.

FAIR, T., CARTER, F., PARK, S., EVANS, A. C., LONERGAN, P.; Global gene expression analysis during bovine oocyte *in vitro* maturation. *Theriogenology*, v.68, n.1, p.91-97, 2007.

FARNWORTH, P. G.; WANG, Y.; LEEMBRUGGEN, P.; OOI, G. T.; HARRISON, C.; ROBERTSON, D. M.; FINDLAY, J. K. Rodent adrenocortical cells display high affinity binding sites and proteins for inhibin A, and express components required for autocrine signalling by activins and bone morphogenetic proteins. *Journal of Endocrinology*, v.188, p.451-465, 2006.

FAURE, M. O.; NICOL, L.; FABRE, S.; FONTAINE, J.; MOHORIC, N.; MCNEILLY, A.; TARAGNAT, C. BMP-4 inhibits follicle-stimulating hormone secretion in ewe pituitary. *Journal of Endocrinology*, v.186, p.109-121, 2005.

FITZPATRICK, S. L.; SINDONI, D. M.; SHUGHRUE, P. J.; LANE, M. V.; MERCHENTHALER, I. J.; FRAIL, D. E. Expression of growth differentiation factor-9 messenger ribonucleic acid in ovarian and nonovarian rodent and human tissues. *Endocrinology*, v.139, p.2571-2578, 1998.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v.78, p.135-163, 2003.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*, v.82-83, p.109126, 2004.

FRANCIS, G. L.; ROSS, M.; BALLARD, F. J.; MILNER, S. J.; SENN, C.; MCNEIL, K. A.; WALLACE, J. C.; KING, R.; WELLS, J. R. E. Novel recombinant fusion protein analogues of insulin-like growth factor (IGF)-I indicate the relative importance of IGF-binding protein and receptor binding for enhanced biological potency. *Journal of Molecular Endocrinology*, v.8, n.3, p.213-223, 1992.

FUJINO, Y.; OZAKI, K.; YAMAMASU, S.; ITO, F.; MATSUOKA, I.; HAYASHI, E.; NAKAMURA, H.; OGITA, S.; SATO, E.; INOUE, M. DNA fragmentation of oocytes in aged mice. *Human Reproduction*, v.11, p.1480–1483, 1996.

GALLOWAY, S. M.; MCNATTY, K. P.; CAMBRIDGE, L. M.; LAITINEN, M. P. E.; JUENGEL, J. L.; JORIKANTA, T. S.; MCLAREN, R. J., LUIRO, K., DODDS, K. G., MONTGOMERY, G. W., BEATTIE, A. E., DAVIS, G. H., RITVOS, O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics*, v.25, p.279–283, 2000.

GILCHRIST, R. B.; NAYUDU, P. L.; HODGES, J. K. Maturation, fertilization and development of marmoset monkey oocytes *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v.56, p.238-246, 1997.

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

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

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

GIUDICE, L. C. Insulin-like growth factors and ovarian development. *Endocrine Reviews*, v.13, p.641–669, 1992.

GLISTER, C.; TANNETTA, D. S.; GROOME, N. P.; KNIGHT, P. G. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. *Biology of Reproduction*, v.65, p.1020-1028, 2001.

GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; BRAMLEY, T. A.; GUTIERREZ, C. G.; PETERS, A. R.; WEBB, R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biology of Reproduction*, v.55, p.68-74, 1996.

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.33, n.2, p.82-94, 2009.

GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v.62, p.1322-1328, 2000.

HANSEN, P. J. Realizing the promise of IVF in cattle – an overview. *Theriogenology*, v.65, p.119-125, 2006.

HASLER, J. F. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, v.81, p.152-169, 2014.

HAMATANI, T., YAMADA, M., AKUTSU, H., KUJI, N., MOCHIMARU, Y., TAKANO, M., TOYODA, M., MIYADO, K., UMEZAWA, A., YOSHIMURA, Y.; What can we learn from gene expression profiling of mouse oocytes? *Reproduction*, v.135, n.5, p.581-592, 2008.

HERRLER, A.; KRUCHE, C. A.; BEIER, H. M. Insuline and insuline-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biology of Reproduction*, v.59, p.1302-1310, 1998.

HUSSEIN, T. S.; FROILAND, D. A.; AMATO, F.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *Journal of Cell Science*, v.118, p.5257-68, 2005.

HUSSEIN, T. S., SUTTON-MCDOWALL, M. L., GILCHRIST, R. B., THOMPSON, J. G.; Temporal effects of exogenous oocyte-secreted factors on bovine oocyte developmental competence during IVM. *Reproduction, Fertility and Development*, v.23, p.576-584, 2011.

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

IZADYAR, F.; ZEINSTRA, E.; BEVERS, M. M. Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance

developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, v.51, p.339-345, 1998.

JONES, J. I.; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Reviews*, v.16, p.3-34, 1995.

KANE, M. T.; MORGAN, P. M.; COONAN, C. Peptide growth factors and preimplantation development. *Human Reproduction Update*, v.3, p.137-57, 1997.

KATZ-JAFFE, M. G., MCCALLIE, B. R., PREIS, K. A., FILIPOVITS, J., GARDNER, D. K.; Transcriptome analysis of *in vivo* and *in vitro* matured bovine MII oocytes. *Theriogenology*, v.71, n.6, p.939-946, 2009.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, v. 26, p. 239-257, 1972.

KHAN-DAWOOD, F. S.; GARGIULO, A. R.; DAWOOD, M. Y. *In vitro* microdialysis of the ovine corpus luteum of pregnancy: effects of IGF on progesterone secretion. *Biology of Reproduction*, v.51, p.1299–306, 1994.

KIAPEKOU, E.; LOUTRADIS, D.; DRAKAKIS, P.; ZAPANTI, E.; MASTORAKOS, G.; ANTSAKLIS, A. Effects of GH and IGF-I on the *in vitro* maturation of mouse oocytes. *Hormones*, v.4, n.3, p.155-160, 2005.

KIM, M. R.; TILLY, J. L. Current concepts in Bcl-2 family member regulation of female germ cell development and survival. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1644, p.205–210, 2004.

LAN, Z. J.; GU, P.; XU, X.; JACKSON, K.; DEMAYO, F. J.; O'MALLEY, B. W.; COONEY, A. J. GCNF-dependent repression of BMP-15 and GDF-9 mediates gamete regulation of female fertility. *The EMBO Journal*, v.22, p.1–12, 2003.

LEQUARRE, A. S.; VIGNERON, C.; RIBAUOUR, F.; HOLM, P.; DONNAY, I.; DALBIÈS-TRAN, R.; CALLESEN, H.; MERMILLOD, P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology*, v.63, p.841–859, 2005.

LIAO, W. X.; MOORE, R. K.; OTSUKA, F.; SHIMASAKI, S. Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of Bone Morphogenetic Protein-15 (BMP-15) and Growth and Differentiation Factor-9. *Journal of Biological Chemistry*, v.278, p.3713–3719, 2003.

LIGHTEN, A. D.; MOORE, G. E.; WINSTON, R. M.; HARDY, K. Routine addition of human insuline-like growth factor-I ligand could benefit clinical *in vitro* fertilization culture. *Human Reproduction*, v.13, p.3144-3150, 1998.

LIU, J.; SIROIS, J. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. *Biology of Reproduction*, v.58, p.1527-1532, 1998.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M. P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence follwing maturation, fertilization, and culture *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, v.37, p.48-53, 1994.

MAGALHÃES, D. M.; SALES, E. T.; PADILHA, R. T.; SILVA, T. F. P.; TONIOLI, R.; FIGUEIREDO, J. R. Hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I): importantes reguladores das foliculogêneses *in vivo* e *in vitro*. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.36, n.1, p.32-38, 2012.

MAMO, S., CARTER, F., LONERGAN, P., LEAL, C. L. V., NAIB, A. A., MCGETTIGAN, P., MEHTA, J. P., EVANS, A. C. O., FAIR, T.; Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and in vitro matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. *BMC Genomics*, v. 12, n.151, p.1-14, 2011.

MATWEE, C.; BETTS, D. H.; KING, W. A. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote*, v.8, p.57-68, 2000.

MCARDLE, C. A.; HOLTORF, A. P. Oxytocin and progesterone release from bovine corpus luteal cells in culture: effects of insulin-like growth factor-I, insulin and prostaglandins. *Endocrinology*, v.124, p.1278-1286, 1989.

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, p.379–386, 2004.

MERMILLOD, P.; OUSSAID, B.; COGNIE, Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.54, p.449-460, 1999.

MIHM, M.; AUSTIN, E. J.; GOOD, T. E. M.; IRELAND, J. L. H.; KNIGHT, P. G.; ROCHE, J. F.; IRELAND, J. J. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biology of Reproduction*, v.63, p.811-819, 2000.

MONGET, P.; MONNIAUX, D.; DURAND, P. Localization, characterization and qualification of insulin-like growth factor-I-binding sites in the ewe ovary. *Endocrinology*, v.125, p.2484-2493, 1989.

MONGET, P.; FABRE, S.; MULSANT, P.; LECERF, F.; ELSEIN, J. M.; MAZERBOURG, S.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology*, v.23, p.139-154, 2002.

NICHOLAS, B., ALBERIO, R., FOULADI-NASHTA, A. A., WEBER, R.; Relationship between low-molecular-weight insulin-like growth factor-binding proteins, caspase-3 activity, and oocyte quality. *Biology of Reproduction*, v.72, p.769-840, 2005.

NICHOLLS, P. K.; HARRISON, C. A.; GILCHRIST, R. B.; FARNWORTH, P. G.; STANTON, P. G. Growth differentiation factor 9 (GDF9) is a germ-cell regulator of Sertoli cell function. *Endocrinology*, v.150, p.2481–2490, 2009.

NUTTINCK, F.; REINAUD, P.; TRICOIRE, H.; VIGNERON, C.; PEYNOT, N.; MIALOT, J. P.; MERMILLOD, P.; CHARPIGNY, G. Cyclooxygenase-2 is expressed by cumulus cells during oocyte maturation in cattle. *Molecular Reproduction and Development*, v.61, p.93-101, 2002.

NUTTINCK, F.; CHARPIGNY, G.; MERMILLOD, P.; LOOSFELT, H.; MEDURI, G.; FRERET, S.; GRIMARD, B.; HEYMAN, Y. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. *Domestic Animal Endocrinology*, v.27, p.179-195, 2004.

OLA, M. S.; NAWAZ, M.; AHSAN, H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.351, p.41-58, 2011.

ORISAKA, M.; JIANG, J. Y.; ORISAKA, S.; KOTSUJI, F.; TSANG, B. K. Growth Differentiation Factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis. *Endocrinology*, v.150, p.2740–2748, 2009.

OTSUKA, F.; SHIMASAKI, S. A novel function of Bone Morphogenetic Protein-15 in the pituitary: selective synthesis and secretion of FSH by gonadotropes. *Endocrinology*, v.146, p.4938–4941, 2002.

PALMA, G. A.; MULLER, M.; BREM, G. Effect of insulin-like growth I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.110, p.347-353, 1997.

PAMPUSCH, M. S.; XI, G.; KAMANGA-SOLLO, E.; LOSETH, K. J.; HATHAWAY, M. R.; DAYTON, W. R.; WHITE, W. E. Production of recombinant porcine IGF-binding

protein-5 and its effect on proliferation of porcine embryonic myoblast cultures in the presence and absence of IGF-I and Long-R3-IGF-I. *Journal of Endocrinology*, v.185, p.197-206, 2005.

PANGAS, S. A.; MATZUK, M. M. The art and artifact of GDF9 activity: cumulus expansion and the cumulus expansion-enabling factor. *Biology of Reproduction*, v.73, p.582–585, 2005.

PARK, J. Y.; SU, Y. Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S. L.; CONTI, M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*, v.303, p.682–684, 2004.

PATTON, J.; KENNY, D. A.; MCNAMARA, S.; MEE, J. F.; O'MARA, F. P.; DISKIN, M. G.; MURPHY, J. J. Relationships among milk production, energy balance, plasma analytes, and reproduction in Holstein–Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, v.90, p.649-658, 2007.

PAULINI, F.; MELO, E. O. The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 46, p.354-361, 2011.

PAWSHE, C. H.; APPARAO, K. B. C.; TOTEY, S. M. Effect of insulin-like growth factor I and its interaction with gonadotropins on *in vitro* maturation and embryonic development, cell proliferation and biosynthesis activity of cumulus-oocyte complexes and granulosa cells in buffalo. *Molecular Reproduction and Development*, v.49, p.277–285, 1998.

PENNETIER, S.; UZBEKOVA, S.; PERREAU, C.; PAPILLIER, P.; MERMILLOD, P.; DALBIES-TRAN, R. Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos. *Biology of Reproduction*, v.71, p.1359–1366, 2004.

PEREZ, G. I.; XIAO-JING, T.; TILLY, J. L. Fragmentation and death (a.k.a. apoptosis) of ovulated oocytes. *Molecular Human Reproduction*, v.5, n.5, p.414-420, 1999.

PERKS, C. M.; PETERS, A. R.; WATHES, D. C. Follicular and luteal expression of insulin-like growth factors-I and -II and the type I IGF receptor in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.116, p.157-165, 1999.

PERRY, G. *Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. IETS Data Retrieval Committee*, p.1-23, 2013. Disponível em: <http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2013.pdf> Acesso em: 19/08/14, 09:50.

PRELLE, K.; STOJKOVIC, M.; BOXHAMMER, K.; MOTLIK, J.; EWALD, D.; ARNOLD, J. G.; WOLF, E. Insuline-like growth fator I (IGF-I) and Long R3 IGF-I differently affect development and Messenger ribonucleic acid bundance for IGF-binding proteins and type I IGF receptors in *in vitro* produced bovine embryos. *Endocrinology*, v.142, n.3, p.1309-1316, 2001.

QUIRK, S. M.; COWAN, R. G.; HARMAN, R. M.; HU, C. L.; PORTER, D. A. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *Journal of Animal Science*, v.82, p.40-52, 2004.

RICHANI, D.; RITTER, L. J.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Mode of oocyte maturation affects EGF like peptide function and oocyte competence. *Molecular Human Reproduction*, v.19, p.500-09, 2013.

RICHANI, D.; SUTTON-MCDOWALL, M. L.; FRANK, L. A.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Effect of epidermal growth factor-like peptides on the metabolism of *in vitro* matured mouse oocytes and cumulus cells. *Biology of Reproduction*, v.3, n.49, p.1-16, 2014.

RICHARDS, J. S. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Reviews*, v.15, p.725–751, 1994.

RICHARDS, J. S. Editorial: sounding the alarm-does induction of prostaglandin endoperoxyde synthase-2 control the mammalian ovulatory clock? *Endocrinology*, v.138, p.4047-4048, 1997.

RIVERA, G. M.; FORTUNE, J. E. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. *Endocrinology*, v.144, p.2977–2987, 2003.

SADIGHI, M.; BODENSTEINER, K. J.; BEATTIE, A. E.; GALLOWAY, S. M. Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome 5. *Animal Genetics*, v.33, p.244–245, 2002.

SAKAGUCHI, M.; DOMINKO, T.; YAMAUCHI, N.; LEIGFRIED-RUTLEDGE, L.; NAGAI, T.; FIRST, N. L. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors *in vitro*. *Reproduction*, v.123, p. 135-142, 2002.

SÁNCHEZ, F., SMITZ, J.; Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1822, p.1896-1912, 2012.

SAUERWEIN, H.; MIYAMOTO, A.; GUNTHER, J.; MEYER, H. H. D.; SCHAMS, D. Binding and action of insulin-like growth factors and insulin in bovine luteal tissue

during the oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.96, p.103-115, 1992.

SAYRE, B. L.; TAFT, R.; INSKEEP, E. K.; KILLEFER, J. Increased expression of insulin-like growth factor binding protein-1 during induced regression of bovine corpora lutea. *Biology of Reproduction*, v.63, p.21-29, 2000.

SCHAMS D. Luteal peptides and intercellular communication. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.34, p.87-99, 1987.

SCHAMS, D.; BERISHA, B.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W. M. Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. *Domestic Animal Endocrinology*, v.22, p.51-72, 2002.

SHIMADA, M.; HERNANDEZ-GONZALEZ, I.; GONZALEZ-ROBAYNA, I.; RICHARDS, J. S. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Molecular Endocrinology*, v.20, p.1352-1365, 2006.

SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insuline-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*, v.71, p.1193-1208, 2009.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, v.65, p.126-136, 2006.

SIRARD, M. A.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. *Theriogenology*, v.68, n.1, p.S71-76, 2007.

SIROTKIN, A. V.; DUKESOVA, J.; MAKAREVIVH, A. V.; KUBEK, A.; BULLA, J. Evidence that growth factors IGF-I, IGF-II and EGF can stimulate nuclear maturation of porcines oocytes via intracellular protein kinase A. *Reproduction Nutrition Development*, v.40, p.559-569, 2000.

SIROTKIN, A. V.; BEZÁKOVÁ, A.; LAURINCÍK, J.; MATEJOVICOVÁ, B. Involvement of the metabolic hormones leptina, ghrelin, obestatin, IGF-I and MAP Kinase in control of porcine oocyte maturation. *Animal*, v.5, n.1, p.94-99, 2011.

SPICER, L. J.; ALPIZAR, E.; ECHTERNKAMP, S. E. Effects of insulin, insulin-like growth factor-I and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production and (or) insulin-like growth factor-I production *in vitro*. *Journal of Animal Science*, v.71, p.1232-1241, 1993.

SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E. The ovarian insulin and insulin like growth factor system with emphasis on domestic animals. *Domestic Animals Endocrinology*, v.12, p.223-245, 1995.

SPICER, L. J. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. *Biology of Reproduction*, v.70, p.1223-1230, 2004.

SPICER, L. J.; AAD, P. Y. Insulin-like growth factor (IGF) 2 stimulates steroidogenesis and mitosis of bovine granulosa cells through the IGF1 receptor: role of follicle-stimulating hormone and IGF2 receptor. *Biology of Reproduction*, v.77, p.18-27, 2007.

SONG, J. L.; WESSEL, G. M. How to make an egg: transcriptional regulation in oocytes. *Differentiation*, v.73, p.1–17, 2005.

TAKASE, K.; ISHIKAWA, M.; HOSHIAI, H. Apoptosis in the degeneration process of unfertilized mouse ova. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, v.175, p.69–76, 1995.

TALAVERA, F.; MENON, K. M. J. Studies on rat luteal cell response to insulin-like growth factor-I (IGF-I): identification of a specific cell membrane receptor for IGF-I in the luteinized rat ovary. *Endocrinology*, v.129, p.1340–1346, 1991.

THOMAS, F. H.; CAMPBELL, B. K.; ARMSTRONG, D. G.; TELER, E. E. Effects of IGF-I bioavailability on bovine preantral follicular development *in vitro*. *Reproduction*, v.133, p.1121-1128, 2007.

THOMAS, R. E.; THOMPSON, J. G.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during *in vitro* maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. *Biology of Reproduction*, v.71, p.1142-1149, 2004.

TILLY, J. L. Cell death and species propagation: molecular and genetic aspects of apoptosis in the vertebrate female gonad. In: LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z.; TILLY, J. L. *When Cells Die. A Comprehensive Evaluation of Apoptosis and Programmed Cell Death*. Wiley-Liss, New York, USA, 1998, p. 431–452.

TREMBLAY, K.; VIGNEAULT, C.; MCGRAW, S.; MORIN, G.; SIRARD, M. A. Identification and characterization of a novel bovine oocyte-specific secreted protein gene. *Gene*, v. 375, p.44-53, 2006.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v.63, p.1717-1751, 2005.

VELAZQUEZ, M. A.; NEWMAN, M.; CHRISTIE, M. F.; CRIPPS, P. J.; CROWE, M. A.; SMITH, R. F.; DOBSON, H. The usefulness of a single measurement of insulin-like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a bovine MOET program. *Theriogenology*, v.64, p.1977-1994, 2005.

VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P. W. DNA strand breaks and phosphatidylserine redistribution in newly ovulated and cultured mouse and human oocytes: occurrence and relationship to apoptosis. *Human Reproduction*, v.13, p.1317-1324, 1998.

WALTERS, K. A.; BINNIE, J. P.; CAMPBELL, B. K.; ARMSTRONG, D. G.; TELFER, E. E. The effects of IGF-I on bovine follicle development and IGFBP-2 expression are dose and stage dependent. *Reproduction*, v.131, p.515-23, 2006.

WANDJI, S. A.; SRSEN, V.; VOSS, A. K.; EPPIG, J. J.; FORTUNE, J. E. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. *Biology of Reproduction*, v.55, p.942-948, 1996.

WANG, Y.; NICHOLLS, P. K.; STANTON, P. G.; HARRISON, C. A.; SARRAJ, M.; GILCHRIST, R. B.; FINDLAY, J. K.; FARNWORTH, P. G. Extra-ovarian expression and activity of growth differentiation factor 9. *Journal of Endocrinology*, v.202, p.419-430, 2009.

WARZYCH, E.; PEIPPO, J.; SZYDLOWSKI, M.; LECHNIAK, D. Supplements to *in vitro* maturation media affect the production of bovine blastocysts and their apoptotic index but not the proportions of matured and apoptotic oocytes. *Animal Reproduction Science*, v.97, n.3-4, p.334-343, 2006.

WASIELAK, M.; BOGAKI, M. Apoptosis inhibition by Insuline-Like Growth Factor (IGF)-I during *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, v.53, n.2, p.419-426, 2007.

WATSON, A. J.; WESTHUSIN, M. E.; WINGER, Q. A. IGF paracrine and autocrine interactions between conceptus and oviduct. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.54, p.303-315, 1999.

WATSON, A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of Animal Science*, v. 85, p.E1-E3, 2007.

WEI, M. C.; ZONG, W. X.; CHENG, E. H.; LINDSTEN, T.; PANOUTSAKOPOULOU, V.; ROSS, A. J.; ROTH, K. A.; MACGREGOR, G. R.; THOMPSON, C. B.; KORSMEYER, S. J. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, v.292, p.727-730, 2001.

YAN, C.; PENDOLA, F. L.; JACOB, R.; LAU, A. L.; EPPIG, J. J.; MATZUK, M. M. Oosp1 encodes a novel mouse oocyte-secreted protein. *Genesis*, v.31, p.105-110, 2001.

YANG, M. Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Animal Reproduction Science*, v.70, p.159–169, 2002.

YOSHIDA, Y.; MIYAMURA, M.; HAMANO, S.; YOSHIDA, M. Expression of growth factor ligand and their receptor mRNAs in bovine ova during *in vitro* maturation and after *in vitro* fertilization. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.60, n.5, p.549-554, 1997.

YOULE, R. J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.9, p.47–59, 2008.

YUAN, W.; LUCY, M. C.; SMITH, M. F. Messenger ribonucleic acid for insulin-like growth factors-I and -II, insulin-like growth factor binding protein-2, gonadotropin receptors and steroidogenic enzymes in porcine follicles. *Biology of Reproduction*, v.55, p.1045–1054, 1996.

YUAN, Y. Q.; VAN SOOM, A.; LEROY, J. L.; DEWULF, J.; VAN ZEVEEREN, A.; DE KRUIF, A.; PEELMAN, L. J. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology*, v.63, p.2147-2163, 2005.

ZHOU, J.; BIEVRE, M.; BONDY, C. A. Reduced GLUT 1 expression in IGF1-/- null oocytes and follicles. *Growth Hormone IGF Research*, v.10, p.111-117, 2000.

CAPÍTULO 2 – Artigo Científico

Trabalho a ser enviado para a revista Zygote, o qual se encontra de acordo com as normas de submissão exigidas disponíveis no site:

http://assets.cambridge.org/ZYG/ZYG_ifc.pdf

Addition effects of IGF-1 or LongR3-IGF-1 on cellular and molecular aspects of *cumulus*-oocyte complexes during *in vitro* maturation in cattle.

M. S. Araujo^a, M. D. Guastali^a, M. H. Tsunemi^b, P. K. Fontes^c, A. C. S. Castilho^c, F. C. Landim-Alvarenga^{a*}

^aCollege of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, FMVZ/UNESP, Botucatu, São Paulo.

^bBiosciences Institute, Department of Biostatistics, IBB/UNESP, Botucatu, São Paulo.

^cBiosciences Institute, Department of Pharmacology, IBB/UNESP, Botucatu, São Paulo.

*All correspondence to: Distrito de Rubião Júnior s/n, cep: 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil. [Tel:+55143880-2119](tel:+55143880-2119). E-mail: fernanda@fmvz.unesp.br

Abstract

Addition effects of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and its synthetic analogue LongR3-IGF-1 after *in vitro* maturation (IVM) of cattle *cumulus*-oocyte complexes (COCs) was compared and evaluated on meiotic progression, apoptosis and profile genes of oocyte competence in oocytes (*GDF9*, *BMP15*, *BAX*, *BCL2*, *OOSP1*, *IGFBP2*, *IGFBP4* and *IGFBP5*) and their respective *cumulus* cells (*AREG*, *EGFR*, *FSHR*, *COX2*, *BAX*, *BCL2*, *IGFBP2*, *IGFBP4* and *IGFBP5*). Bovine ovaries were collected in slaughterhouses, being selected 739 COCs (n= 10 pools). The maturation occurred in the presence of IGF-1 (100ng/mL), LongR3-IGF-1 (100ng/mL), and two control groups, 0.1% polyvinyl alcohol (PVA) or 10% fetal bovine serum (FBS), for 22-24 hours in an incubator at 38.5 °C and 5% CO₂. Statistical analysis was performed by a linear mixed effects model, ANOVA and Tukey tests. There was no statistical difference between experimental groups with respect to meiotic progression and apoptosis (P>0.05). There were statistical differences (p≤0.05) between 10% FBS, IGF-1 and LongR3-IGF-1 groups for *IGFBP4* gene expression and between 0.1% PVA, IGF-1 and LongR3-IGF-1 for *COX2* gene expression in *cumulus* cells. Statistical difference was found for *BCL2* gene

expression between IGF-1, 10% FBS and 0.1% PVA groups and for *IGFBP4* gene expression between LongR3-IGF-1, 0.1% PVA and 10% FBS in oocytes. There was no statistical difference between experimental groups for other genes evaluated. It was possible to perform IVM of bovine oocytes in the presence of LongR3-IGF-1 in replacement of IGF-1 and FBS.

Key-words: Oocyte, *cumulus* cells, *in vitro* fertilization, insuline-like growth factor, gene expression.

Introduction

In an attempt to simulate *in vivo* intrafollicular conditions and to increase developmental competence of oocytes to improve *in vitro* blastocysts production rates, researchs has focused on addition of growth promoting substances in maturation media such as the family of insuline-like growth factors (IGF) (Sirard et al., 2006; Watson, 2007). The use of these factors in replacement of fetal bovine serum (FBS) in culture media has also been proposed. Thus, the harmful effects caused by FBS embryos like spread of disease and increased animal mortality after birth, can be avoided (Abe et al., 1999; Rätty et al., 2011; Del Collado et al., 2014).

The IGFs family comprises IGF-1 and IGF-2 polypeptide ligands, IGFR-1 and IGFR-2 receptors and six IGFs binding proteins such as IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6 (Jones; Clemmons, 1995; Kane et al., 1997; Magalhães et al., 2012). IGF-1 and IGF-2 has great binding affinity to IGFR-1 receptor, wich is the main mediator of IGF ligands actions expressed on cells surface (Spicer, 2004; Magalhães et al, 2012). IGFBPs have high binding affinity to IGFs, carrying up to their target cells, inhibiting or enhancing their actions and regulating bioavailability (Spicer, 2004; Silva et al., 2009).

In bovine IGF system componentes are related to various reproductive events, such as folliculogenesis (Magalhães et al., 2012) conception rate to first service (Patton et al., 2007), early corpus luteum development (Schams et al., 2002) and early embryonic development (Velazquez et al., 2005). The IGF-1 seems to be of great importance to the oocyte function, since their receptors are present in *cumulus*-oocyte complexes (COCs) and large amount of this factor is particularly produced by *cumulus* cells (Zhou et al., 2000; Nuttinck et al., 2004). IGF-1 in IVM increased nuclear maturation rate and favored oocyte competence in addition to inhibit

apoptosis in oocytes and embryos of different species (Kiapekou et al., 2005; Walter et al., 2006; Wasielak; Bogaki, 2007; Sirotkin et al., 2011; Pereira et al., 2011; Meiyu et al., 2014).

The insuline-like growth factor-1 recombinant-3 (LongR3-IGF-1) is a synthetic analogue of IGF-1, which has an amino acid sequence comprising the IGF-1 in its structure, replacement of glycine or arginine for glutamine in position 3 and 13 amino acids at the N-terminal portion (Francis et al., 1992). This structural modification decreases its binding to the IGFBPs, making it more bioavailable to bind to the IGF-1 receptor. The LongR3-IGF-1 has been widely used in follicles and granulosa cells culture, but has not yet been added to IVM culture medium (Francis et al., 1992; Thomas et al., 2007). However the action of this growth factor on the *in vitro* embryo production in cattle has been assessed promoting a stimulus of early embryonic development and increasing the number of blastocyst cells (Prelle et al., 2001).

Beyond nuclear and cytoplasmic maturation oocytes also need undergo molecular changes to ensure the developmental competence until embryonic stage (Fair et al., 1996; Araujo et al., 2014). Distinct pathways and variation in the number of bovine oocyte *in vitro* and *in vivo* matured genes has been observed and may lead changes in embryonic development after fertilization (Katz-Jaffe et al., 2009; Mamo et al., 2011). Therefore mRNA analysis techniques may be used to identify genes involved in the process of nuclear and cytoplasmic maturation, and to identify specific locations that regulate acquisition of oocyte competence (Assou et al., 2006).

Some genes expressed in oocytes and their *cumulus* cells such as *GDF9*, *BMP15*, *COX2*, *OOSP1*, *BAX*, *BCL2*, *EGFR*, *FSHR* and *AREG*, has been related to the acquisition of oocyte competence (Paulini et al., 2001; Nuttinck et al., 2002; Yang; Rajamahendran, 2002; Conti et al., 2006; Tremblay et al., 2006; Assidi et al., 2013). Therefore, this study aimed to evaluate and compare the addition effects promoted by LongR3-IGF-1 and IGF-1 in bovine COCs after IVM on meiotic progression, apoptosis and profile of genes *IGFBP2*, *IGFBP4* and *IGFBP5*, *GDF9*, *BMP15*, *OOSP1*, *AREG*, *EGFR*, *FSHR*, *COX2*, *BAX* and *BCL2*.

Ethical Standards

The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the Ethics Committee on Animal Use from College of Veterinary

Medicine and Animal Science of São Paulo State University with protocol number 166/2013.

Material and Methods

Utilized products

- Modified Dullbecco Flush (DMPBS), Nutricell, Campinas, SP, Brazil.
- Polyvinyl alcohol (PVA), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, cat. P8136.
- TCM Hepes, Gibco, Langley, OK, EUA, cat. 12340-03.
- Petri dish 60x16 mm, TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Switzerland, cat. 93060.
- Sterile mineral oil, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, cat. M8410-1L.
- LongR3-IGF-1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, cat. I1271-0.
- TCM 199, Gibco, Langley, OK, EUA, cat. 11150-059.
- Piruvate, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, cat. P3662-25G.
- FSH, Folltropin-V®, Bioniche, Belleville, Ontário, Canadá.
- LH, Lutropin-V®, Bioniche, Belleville, Ontário, Canadá.
- Streptomycin and Penicillin, Gibco, Langley, OK, EUA, cat. 15140-122.
- IGF-1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, cat. SRP3069.
- In situ cell death detection kit fluorescein, Roche®, cat. 11684795910.
- Hoechst 33342, Invitrogen, SP, Brazil, cat. H1399.
- Polyvinylpyrrolidone (PVP), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, cat. P0930.
- 8% paraformaldehyde, EMS, Hatfield, Filadélfia, EUA, cat. 157-8.
- Triton X-100, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, cat. T8787.
- Sodium citrate, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, cat. S4641.
- DNase I – Amplification Grade, Invitrogen, SP, Brazil, cat. 18068-015.
- RNeasy Mini Kit®, Qiagen, Mississauga, Ontário, Canadá, cat. 74104.
- SuperScript III Reverse Transcriptase®, Invitrogen, SP, Brazil, cat. 18080-051.
- RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor®, Invitrogen, SP, Brazil, cat. 10777-019.
- Power SYBR®Green PCR Master Mix, Applied Biosystem, SP, Brazil, cat. 4368702.

- High Capacity cDNA Archive Kit, Life Technologies Corporation, Carlsbad®, CA, EUA, cat. 4322171.

Ovaries collection, oocyte aspiration and selection

Bovine ovaries were collected at Modelli® (latitude 22°18'18"S, longitude 49°02'42"W) and Frigor® (latitude 22°35'42"S, longitude 48°47'6"W) slaughterhouses. Ovaries were carried out to laboratory in thermo bottles containing saline solution (NaCl 0.9%) at 38°C. The average time between ovaries collection and follicles aspiration was 2 hours. Before follicular aspiration, ovaries were washed with NaCl 0.9% at 38°C. Follicles between 2-8 mm in diameter were aspirated with 10 mL syringe and needle 40x12mm. Only COCs with homogeneous cytoplasm, surrounded by at least three layers of compact *cumulus* cells were selected for the experiment. The selection was carried out using a stereomicroscope (*Leica®*, *Wetzlar, Germany, S8APO model*) in DMPBS 0.1% PVA supplemented medium. Selected oocytes were transferred to 60x16mm petri dishes with TCM Hepes at 38°C.

In Vitro Maturation

All maturation medium were prepared one hour before ovaries collection and maintained in incubator at 38.5°C and 5% CO₂ until maturation. The basic maturation medium was composed by TCM199, 0.011g/mL pyruvate, 1000µg/mL FSH, 5µg/mL LH and 100µg/mL streptomycin and penicillin. The two control groups were composed by basic medium plus 0.1% PVA or 10% FBS. The IGF-1 and LongR3-IGF-1 groups were composed by basic medium plus 100ng/mL IGF-1 and 100ng/mL LongR3-IGF-1, respectively.

Oocytes matured in the presence of IGF-1, LongR3-IGF-1 or PVA were subsequently washed in three 90µl basic medium droplets before being transferred to maturation dishes. Oocytes matured in the presence of FBS were washed in three 90µl basic medium plus 10% FBS droplets. The IVM was performed in petri dishes (60x16mm) with 90µl droplets of the respective medias, covered with sterile mineral oil. An additional 90µl basic medium plus 10% FBS drop was added to the plate for maturation of oocytes from positive and negative TUNEL technique control. Oocytes

were maintained in incubator (*Forma™ Series II 3110 Water-Jacketed CO₂ incubator*) with 5% CO₂ and 38,5°C temperature atmosphere for 22-24 hours.

After 22 hours of maturation a group of oocytes was randomly chosen to be denuded, while the others remained in the incubator until denudation. The time required for denude all oocytes was 2 hours. At the beginning of each routine a rotation of oocytes groups to be denuded was performed in order to switch the group remaining in the incubator until maximum period of 24 hours of maturation. Therefore, oocytes did not remain for a period greater than 24 hours in the incubator, which could lead to degeneration. Ten replicates were carried out, being added 23 oocytes in each maturation drop, since after conducting various pilot replicates was observed a loss of approximately 10% of oocytes during denudation and handling processes. Thus we increased the number of oocytes added to maturation droplets.

TUNEL assay and Hoechst 33342 staining

After maturation, *cumulus* cells from all oocytes were mechanically removed by repeated pipetting (Fig. 1). The denuded oocytes were washed in DMPBS plus 0.1% PVP and fixed in the final solution of 4% paraformaldehyde (8% paraformaldehyde) in DMPBS for one hour at room temperature. After fixation they were permeabilized with Triton X-100 solution and 0.1% sodium citrate in DMPBS for a further hour at room temperature. Finally, the oocytes were washed in DMPBS solution plus 0.1% PVP.

Positive and negative Oocytes controls were subjected to pre-incubation in DNase solution at 37°C for 1 hour in a humid chamber in the dark and then washed in DMPBS solution plus 0.1% PVP. Then all oocytes were submitted to Mix TUNEL solution for 1 hour at 37°C in a humidified chamber in the dark, except for the negative control oocytes, which were incubated in the absence of the enzyme terminal transferase. Finally oocytes were washed in DMPBS plus 0.1% PVP.

For visualization of oocytes genetic material they were deposited on slides containing 5µl of Hoechst 33342 solution (1mg/mL) covered by coverslip. The visualization of fluorescent genetic material in blue (Hoechst 33342 dyestuff) was checked by epifluorescence microscopy (*Leica® DMI 300B*, 365nm excitation filter and 420nm emission filte) indicating meiotic cells stages, which were subdivided

into metaphase 1 and metaphase 2. Metaphase 2 oocytes had two fluorescent genetic material in blue (one from polar body and another from oocyte) and were considered mature, while oocytes in metaphase 1 had only one fluorescent genetic material being considered immature (Fig. 1).

In TUNEL assay, visualization of fluorescent genetic material in green (Leica® type DMI, 450-490nm excitation filter and 515 nm emission filter) indicated cells with fragmented DNA, and were classified as TUNEL-positive oocytes, while those who had only green fluorescent cytoplasm with no fluorescent genetic material in green were considered TUNEL-negative oocytes (Fig. 2). Oocytes TUNEL-positive showing a single green fluorescent genetic material was found in metaphase 1, while those showing two fluorescent green genetic materials were considered in metaphase 2.

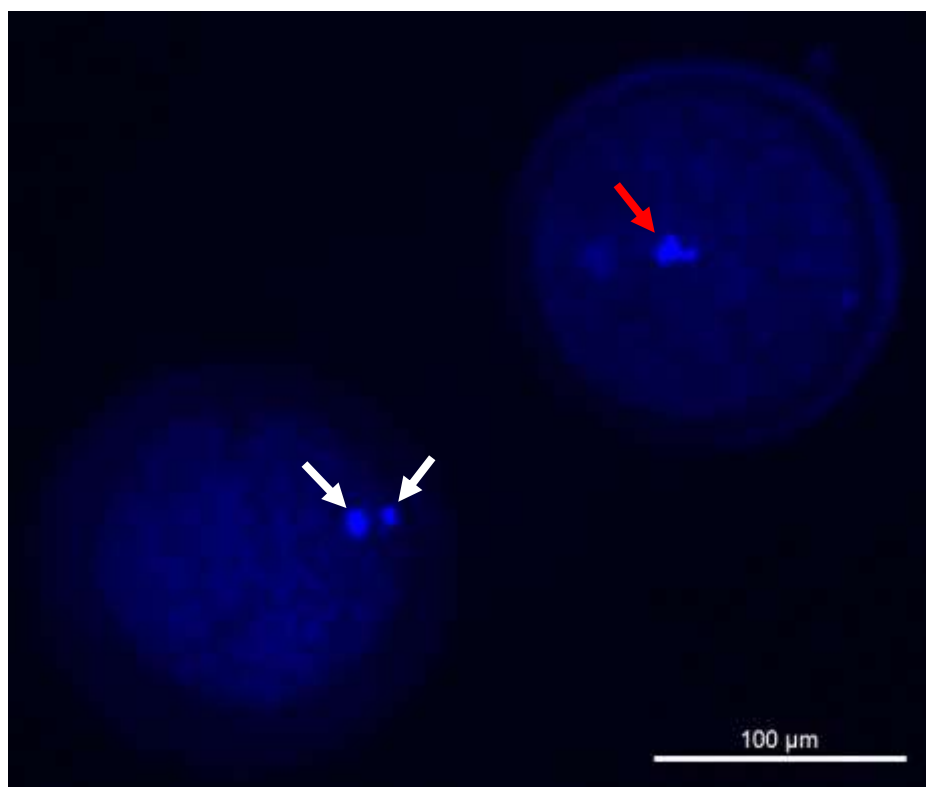


Figure 1. Oocytes stained with Hoechst 33342 viewed in an epifluorescence microscope and classified into metaphase 1 stage for presenting only one fluorescent genetic material (red arrow) or metaphase 2 stage, when presenting two fluorescent genetic materials (white arrows).

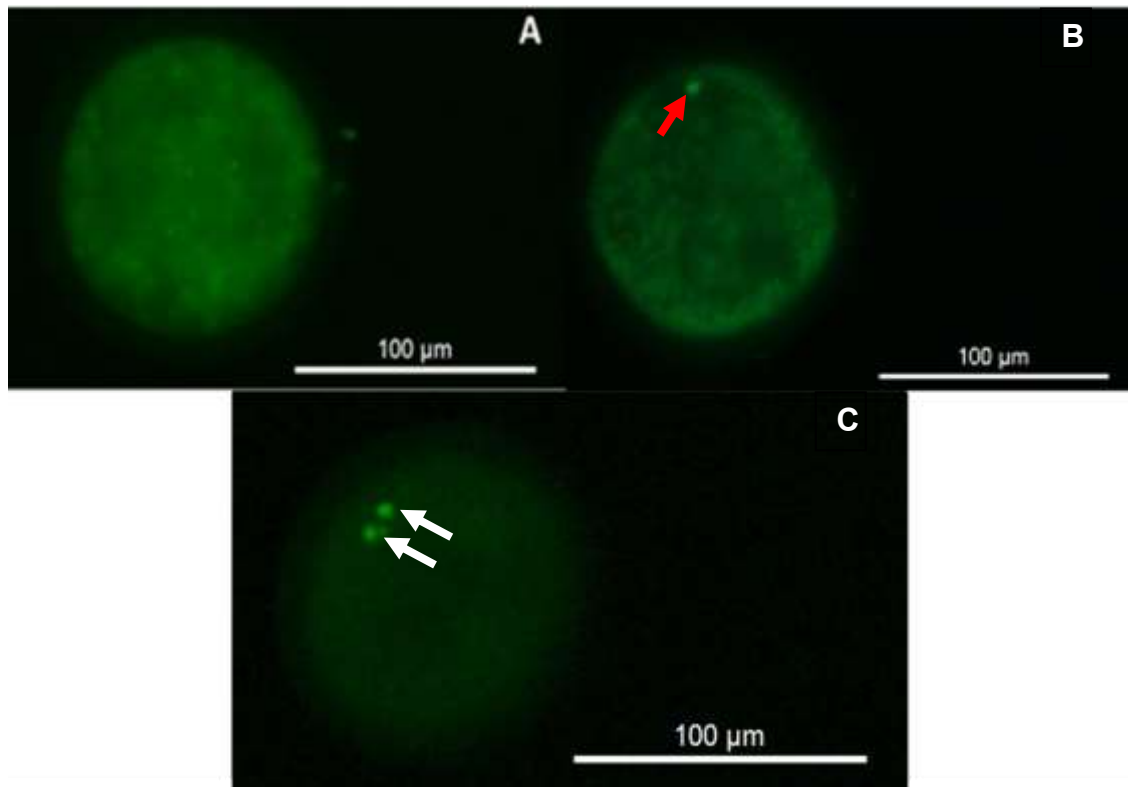


Figure 2. Oocytes viewed with an epifluorescence microscope after TUNEL assay and classified as TUNEL-negative oocyte (A), metaphase 1 TUNEL-positive oocyte with a single fluorescent genetic material (red arrow) (B) and metaphase 2 TUNEL-positive oocyte with two fluorescent genetic material (white arrow) (C).

Abundance quantification of mRNA in cumulus-oocyte complexes

Pools of 20 oocytes and their *cumulus* cells ($n = 5$ pools/experimental group) were mechanically separated by repeated pipetting in DMPBS with 0.1% PVA after maturation. Denuded oocytes and their respective *cumulus* cells were washed three times in DMPBS and stored separately in sterile tubes of 1.5ml with 350µl of Lysis RLT Buffer (RNeasy Micro Kit®) and maintained at -80°C freezer.

Total RNA extraction of oocytes pools and their corresponding *cumulus* cells was performed using the RNeasy Micro Kit® following the manufacturer's specifications. The total RNA concentration of *cumulus* cells samples was measured using the NanoDrop spectrophotometer ND® 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). At the end of extraction, the total RNA samples were solubilized in 20µL distilled and autoclaved water and stored in -80°C freezer until the completion of the reverse transcription (RT).

In order to prevent a possible contamination by genomic DNA interfering with the results, 8µl of total RNA from oocytes and 100 ng of total RNA from *cumulus* cells

were treated with DNase before being subjected to RT-qPCR, as instructed by protocol DNase I - Amplification Grade. A 1µl of DNase buffer, 1µl of DNase I (1CD / microl) and water "RNase free" enough to complete 50µL were added to the final volume. This solution stood at room temperature for 15 minutes and then was added 1µl of EDTA (25 mM) and incubated at 65 ° C for 10 minutes to inactivate the enzyme. After this procedure, the samples were transferred to ice and immediately subjected to the reverse transcription reaction.

In order to prevent a possible contamination by genomic DNA, 8µl of oocytes total RNA and 100ng of *cumulus* cells total RNA were treated with DNase before being subjected to RT-qPCR, as instructed by protocol *DNase I - Amplification Grade*. Was added 1µl of DNase buffer, 1µl of DNase I (1unit/µl) and "RNase free" water enough to complete 50µl to the final volume. This solution remained at room temperature for 15 minutes and then was added 1µl of EDTA (25 mM) and incubated at 65°C for 10 minutes to inactivate the enzyme. After this procedure, the samples were transferred to ice and immediately subjected to the reverse transcription reaction.

For the reverse transcription reaction, the High Capacity cDNA Archive Kit system was used according to manufacturer's specifications. Quantitation of the relative abundance of the target mRNA by RT-qPCR was performed in the equipment StepOne Plus Systems™ Real Time PCR (Applied Biosystems), using the system power SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) together with bovine specific oligonucleotide primers. The *GDF9*, *BMP15*, *BAX*, *BCL2*, *OOSP1*, *IGFBP2*, *IGFBP4* and *IGFBP5* mRNA abundance was measured on oocytes pools, and the *AREG*, *EGFR*, *FSHR*, *COX2*, *BAX*, *BCL2*, *IGFBP2*, *IGFBP4* and *IGFBP5* was measured on corresponding *cumulus* cells.

Genes abundance differences were normalized by frequency of expression of what was considered the best endogenous control for each cell type (GAPDH, H2FAZ or PPIA). To select the most stable endogenous gene, the three aforementioned genes had their expression pattern compared using the geNorm software for Microsoft Excel (medgen.ungent.be/genorm)[36]. For both cell types PPIA proved to be the best endogenous gene. The relative expression of analyzed genes was determined by $\Delta\Delta\text{ct}$ method using the equation described by Pfaffl (Pfaffl, 2001).

Statistical Analysis

Statistical analysis of data obtained after performing TUNEL and staining with Hoechst 33342 techniques was performed by a linear mixed effects model, which related change in metaphase 1 stage to metaphase 2 stage and the absence of apoptosis among experimental groups, since oocytes in apoptosis that reached metaphase 2 stage will not be able to fertilization. Binomial variable response with logit link function of the R program by tool "lmer" from lme4 package was considered (Bates et al., 2011). For statistical analysis of gene expression we used the test for analysis of variance (ANOVA) and Tukey test to compare means. All relevant results were considered significantly when $P \leq 0.05$.

Results

At the end of five replicates 339 oocytes were evaluated (Table 1) for meiotic progression and apoptosis after IVM bovine COCs in the presence of 10% SFB, 0.1% PVA, 100 ng/mL IGF-1 or 100 ng/mL LongR3-IGF-1. Of these, 63.09% (53/84) 65.06% (54/83) 61.79% (55/89) and 75.90% (63/83) were in metaphase 2 stage without apoptosis while 36.90% (31/84) 34.93% (29/83) 38.20% (34/89) and 24.09% (20/83) were in metaphase 1 stage with no apoptosis or metaphase stage 2 with apoptosis, respectively (Graph 1 and Graph 2). There was no statistical difference between experimental groups concerning meiotic progression and occurrence of apoptosis ($P > 0.05$).

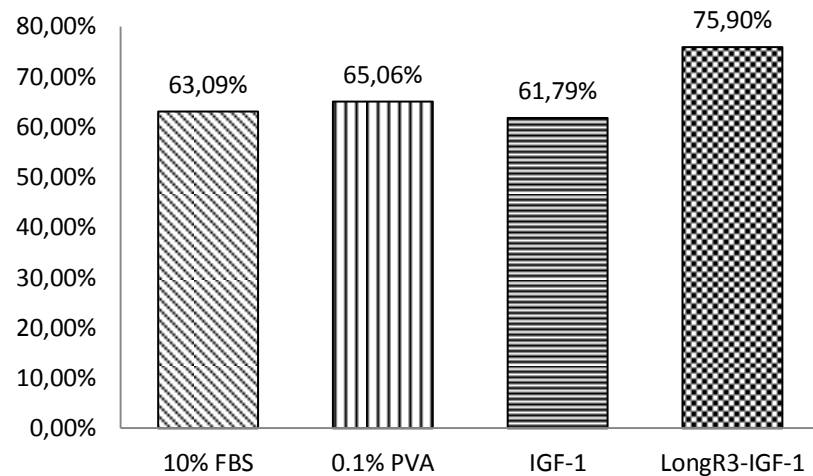
Table. 1. Amount of oocytes in metaphase 1 stage with and without apoptosis or metaphase 2 with apoptosis and metaphase 2 without apoptosis, after performing TUNEL and Hoechst 33342 staining techniques for each experimental group compared to LongR3-IGF-1 group at the end of five replicates of IVM.

Experimental Groups	M1 (with and without apoptosis) or M2 (with apoptosis)	M2 (without apoptosis)	Total
10% FBS	31	53	84
0.1% PVA	29	54	83
IGF-1	34	55	89
LongR3-IGF-1	20	63	83
Total	114	225	339

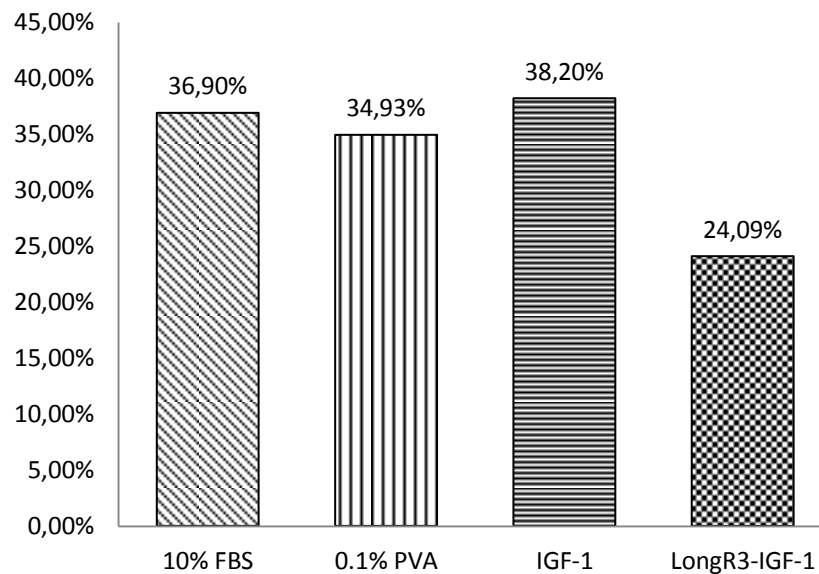
M1: Metaphase 1 oocytes

M2: Metaphase 2 oocytes

Graph 1. Percentage of metaphase 2 stage oocytes without apoptosis for each experimental groups after TUNEL and Hoechst 33342 staining techniques at the end of five replicates of IVM.



Graph 2. Percentage of metaphase 1 stage oocytes with and without apoptosis or metaphase 2 stage with apoptose for each experimental groups after TUNEL and Hoechst 33342 staining techniques at the end of five replicates of IVM.



For gene expression assessment in oocytes and their *cumulus* cells, 400 COCs were used after completion of five replicates of IVM as described previously. It was possible to detect the mRNA expression of all the genes evaluated in oocytes and their *cumulus* cells in all experimental groups (Fig. 3 and Fig. 4). There was statistical difference between the 10% FBS group and the IGF-1 and LongR3-IGF-1 groups for *IGFBP4* gene expression in *cumulus* cells (Fig. 3). The expression of *COX2* gene was also statistically different between 0.1% PVA group and both IGF's groups (Fig. 3). Statistical difference was found for *BCL2* gene expression in oocytes between *IGF-1*, 10% FBS and 0.1% PVA groups (Fig. 4) and for *IGFBP4* gene expression

between LongR3-IGF-1, 0.1% PVA and 10% FBS groups (Fig. 4). There was no statistical difference between experimental groups for remaining genes evaluated in oocytes and *cumulus* cells.

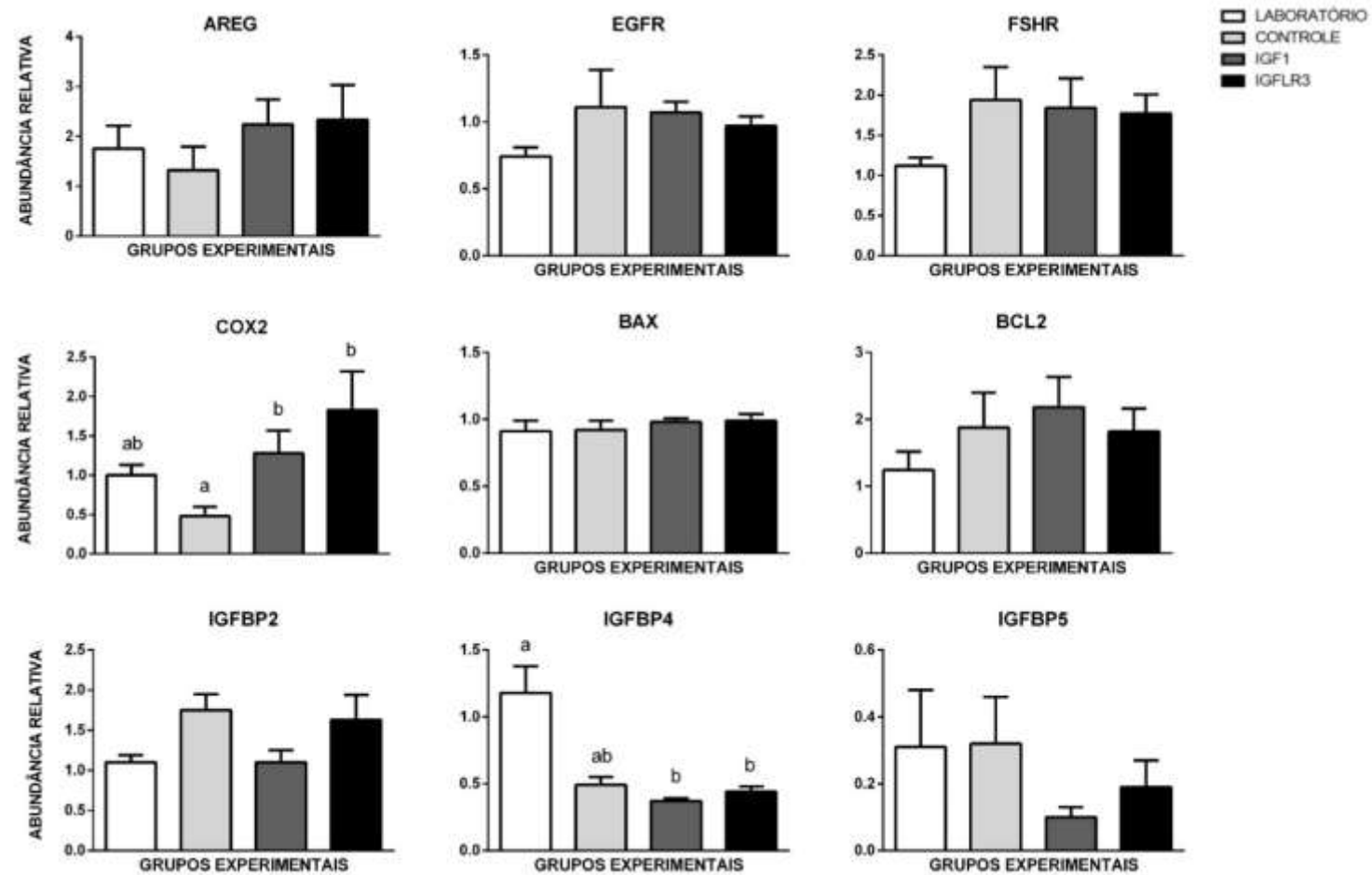


Figure 3. Relative abundance (mean $\pm$ S.E.M.) of *AREG*, *EGFR*, *FSHR*, *COX2*, *BAX*, *BCL2*, *IGFBP2*, *IGFBP4*, and *IGFBP5* mRNA in bovine *cumulus* cells after 22-24 hours of IVM. Data were obtained after five replicates of IVM for each treatment (n = 20 COCs/replicate). Bars with different letters indicate statistical difference ($P \leq 0.05$).

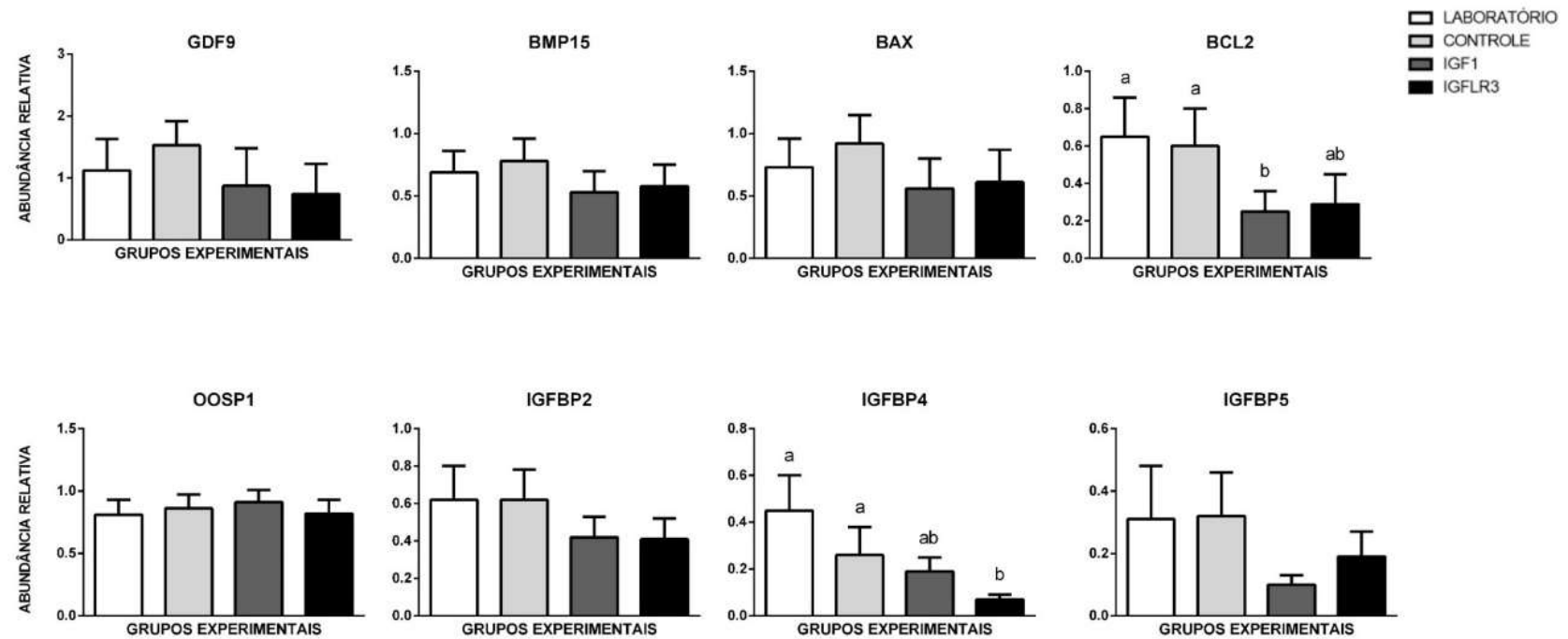


Figure 4. Relative abundance (mean $\pm$ S.E.M.) of *GDF9*, *BMP15*, *BAX*, *BCL2*, *OOSP1*, *IGFBP2*, *IGFBP4*, and *IGFBP5* mRNA in bovine oocytes after 22-24 hours of IVM. Data were obtained after five replicates of IVM for each treatment (n = 20 COCs/replicate). Bars with different letters indicate statistical difference (P $\leq$ 0.05).

Discussion

In the present study no significant differences were observed in IVM rates when oocytes were cultured in the presence of FBS, LongR3-IGF-1 or IGF-1 and even in the absence of growth factors (control group - 0.1% PVA). These results agree with Warzych et al. (2007a) who observed that although quality of in vitro produced blastocysts is directly related to the type of additive added during maturation, meiotic competence and incidence of apoptosis in oocytes were not affected by PVA, FBS or BSA.

Although statistical similarity between groups the results achieved with LongR3-IGF-1 during maturation were numerically higher (75.90%). LongR3-IGF-1 is a synthetic analogue of IGF-1, which has reduced affinity to bind to the IGFBPs therefore have greater bioavailability (Thomas et al., 2007). Therefore we expected a beneficial effect by addition of this growth factor over the other groups which was not observed in this study. Meiyu et al. (2014) did not observed increased number of oocytes in metaphase 2 stage or apoptosis reduction when oocytes were matured in the presence of 100 ng/mL of IGF-1 at 38.5°C for 22 hours compared to 10% FBS group. In contrast, Zhandi et al. (2009) found greater number of oocytes in metaphase 2 stage when matured in the presence of 100 ng/mL of IGF-1 at 38.5°C.

The IGF-1 has a number of metabolic effects including glucose and amino acids transport stimulation and synthesis of proteins and nucleic acids resulting in cellular proliferation (Fabian et al., 2004). In a study carried out by Thomas et al. (2007), bovine preantral follicles ($144.8 \pm 0.6\mu\text{m}$) cultured for six days in the presence of LongR3-IGF-1 (5ng/mL, 10ng/mL, 50ng/mL) and IGF-1 (10ng/mL, 50ng/mL, 100ng/mL, 1000ng/mL), increased follicular diameter and estrogen production above that seen in the control group for both types of IGF. However follicles treated with LongR3-IGF-1 or with the highest concentration of IGF-1 (1000ng/mL) in the culture medium showed a reduction in the proportion of size between oocyte and follicle, and a change in oocyte morphology promoting negative effect in oocyte development. As opposed to noted by these authors, in our study was not observed negative effect on oocyte development when COCs were cultured in the presence of LongR3-IGF-1 perhaps because this has only been added in the final stages of oocyte maturation when oocyte growth is already complete.

In the present experiment the presence of IGF-1 or LongR3-IGF-1 in the maturation medium does not statistically affect the occurrence of apoptosis in COCs. These results corroborate with those obtained by Wasielak and Bogaki (2007), which found no oocyte apoptosis when cultured in the presence of 100 ng/mL IGF-1 after TUNEL analysis. These authors found apoptosis only in a small number of oocytes evaluated by labeling method of active caspase. Kölle et al. (2003) also observed a small number of oocytes undergoing apoptosis after maturation in 100 ng/mL IGF-1 alone or associated with growth hormone (GH). Apoptosis detection in bovine oocytes during *in vitro* maturation is not yet fully consolidated. Yuan et al. (2005) found no apoptotic oocytes after IVM as Matwee et al. (2000) observed 23% of apoptosis in vitro matured oocytes corroborating with results of this experiment. This discrepancy on the effect of IVM in the incidence of apoptosis may be related to the difference in composition of the maturation media used and the methodology of analysis (TUNEL, caspase detection, etc.) (Armstrong et al., 1998).

During embryo culture IGF-1 significantly reduces the number of apoptotic embryo cells, making this substance being considered anti-apoptotic (Makarevich; Markkula, 2002; Fabian et al., 2004). *BAX* (pro-apoptotic) and *BCL2* (anti-apoptotic) proteins are antagonists and operate opening mitochondria ion channels, which results in possible release of cytochrome C and activation of cell death caspase mediated (Yang; Rajamahendran, 2002; Kim; Tilly, 2004; De Bem et al., 2014). In the present experiment *BAX* (pro-apoptotic) and *BCL2* (anti-apoptotic) genes analysis were performed in both oocytes and *cumulus* cells. Lower expression of mRNA for *BCL2* gene in IGF-1 group on oocytes in relation to 10% FBS and 0.1% PVA groups was observed. Armstrong et al. (1998) demonstrated that good quality oocytes and embryos have a higher of *BCL2* protein then *BAX* protein, while in lower quality oocytes *BAX* protein concentration is greater than *BCL2*. Moreover Warzych et al. (2007b) indicated that supplementation of IVM medium with BSA, FBS or PVA did not affect levels of *BAX* and *BCL2* transcripts for both oocytes and bovine embryos produced *in vitro*.

It was not found in literature an analysis of the direct effect of IGF-1 or LongR3-IGF-1 on relative abundance of *BCL2* and *BAX* in cattle oocytes, however *BCL2* mRNA expression was significantly lower in IGF-1 treated oocytes in relation to FBS and PVA. This result agrees with that observed in TUNEL analysis, where greater number of oocytes not completed meiosis or were in apoptosis in IGF-1 group

compared to LongR3-IGF-1 although it was not observed statistical difference. An increase in apoptosis rates in the presence of IGF-1 was also observed by Zhandi et al. (2009) in bovine oocytes subjected to thermal stress at 41°C.

Only four of the six types of IGFBPs (IGFBP2, -3, -4 and -5) were identified in bovine follicular fluid, regulating IGF-1 and IGF-2 bioavailability (Baxter 2000; Mihm et al., 2000; Monget et al., 2002; Spicer, 2004; Silva et al., 2009). The inhibiting action of IGFs is due to its high binding affinity for IGFBPs (Kane et al., 1997; Spicer, 2004; Silva et al., 2009). Low concentrations of *IGFBP-4* and -5 allows greater bioavailability of IGF promoting follicular growth, increasing the effects of FSH and estradiol synthesis (Mihm et al., 2000; Fortune et al., 2004).

The *IGFBP2* and *IGFBP4* seem to be the most produced binding proteins in the follicular cells of ruminants (Amstrong et al., 1996; Armstrong et al., 1998). The *IGFBP4* plays an important role in the establishment of dominance of ovarian follicles in cattle, with a significant reduction in its concentration in the final phase of folliculogenesis (Stewart et al., 1996; Rivera et al., 2001). Satrapa et al. (2013) detected mRNA for *IGFBP4* in immature oocytes from Nellore and Holstein cows, however Nuttinck et al. (2004) only detected expression of this gene in cumulus cells of bovine COCs bovine before and after IVM. In women, high concentrations of IGFBP-1 and -4 associated with low levels of IGF-1 in the follicular fluid were correlated with late embryonic development (Wang et al., 2005).

In our work, COCs matured in the presence of both IGF-1 and LongR3-IGF-1 showed lower mRNA expression for *IGFBP4* in *cumulus* cells relative to 10% FBS group. Similar result was observed in oocytes, where *IGFBP4* expression was statistically lower for LongR3-IGF-1 group compared to 10% FBS and 0.1% PVA groups. The presence of LongR3-IGF-1 in IVM medium promoted a reduction in *IGFBP4* expression, which can be correlated to the number of oocytes in metaphase 2 stage after IVM in this group compared to the others, although statistical differences between treatments were not evidenced.

The expression of *COX2* mRNA and protein have already been demonstrated in granulosa mural cells of preovulatory follicles and bovine *cumulus* cells and oocytes (Liu; Sirois, 1998; Nuttinck et al., 2002; Calder et al., 2005). *COX2* is an important enzyme which controls synthesis of prostaglandin E2, which stimulates *cumulus* cells expansion (Calder et al., 2001). In addition to *cumulus* cells expansion *COX2* appears to be involved with oocyte maturation process. Thus the level of *COX2*

expression after IVM of COCs may represent a marker of maturation improving conditions (Nuttinck et al., 2002). Oocytes matured in the presence of IGF-1 and LongR3-IGF-1 expressed more COX2 mRNA in 0.1% PVA group, however was no statistical difference in meiotic progression of COCs matured in the presence of IGFs in relation to other groups.

Several studies have proposed that mRNA expression levels of various genes can be used as markers of embryo quality (Kuzmany et al., 2011; Stinshoff et al., 2011). However in this experiment there were no differences between treatments in the levels of transcripts of other genes studied. Gardner and Lane (2005) suggested that although oocyte maturation stage is the most sensitive to stress conditions established during *in vitro* culture the answer to environmental conditions often are only observed later during embryonic development.

Conclusion

In the present study it was possible to perform IVM of bovine oocytes in the presence of LongR3-IGF-1 and IGF-1 in replacement of FBS. The addition effects promoted by LongR3-IGf-1 during IVM on subsequent embryonic development still needs to be studied.

Acknowledgements

Mondelli® and Frigol® slaughterhouses for supplying the ovaries, FAPESP and CAPES for their essential financial support and Pharmacology of Reproduction Laboratory from Biosciences Institute – UNESP/Botucatu for carrying out RT-qPCRs.

References

- Abe, H., Yamashita, S., Itoh, T., Satoh, T., Hoshi, H. (1999). Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro* matured and fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Mol Reprod Dev*, 53, 325-335.
- Armstrong, D. G., Hogg, C. O., Campbell, B. K., Webb, R. (1996). Insulin-like growth factor (IGF) binding protein production by primary cultures of ovine granulosa and theca cells. The effect of IGF-I, gonadotropin and follicle size. *Biol Reprod*, 55, 1163–71.
- Armstrong, D. G., Baxter, G., Gutierrez, C. G., Hogg, C. O., Glazyrin, A. L., Campbell, B. K., Bramley, T. A., Webb, R. (1998). Insulin-like growth factor-binding

- protein-2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. *Endocrinology*, 139, 2146–54.
- Araujo, M. S., Guastali, M. D., Volpato, R., Landim, F. C. (2014). Principais mecanismos envolvidos na maturação oocitária em bovinos: da oogênese à maturação *in vitro*. *Enciclopédia Biosfera*, 10, 18, 2373-2388.
- Assidi, M., Richard, F. J., Sirard, M. (2013). FSH *in vitro* versus LH *in vivo*: similar genomic effects on the cumulus. *J Ovarian Res*, 6, 68, 1-13.
- Assou, S., Anahory, T., Pantesco, V., Le Carrou, T., Pellestor, F., Klein, B., Reyftmann, L., Dechaud, H., De Vos, J., Hamamah, S. (2006). The human cumulus-oocyte complex gene-expression profile. *Hum Reprod*, 21, 7, 1705-1719.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. (2011). lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and R syntax. R package version 0.999375-42. Available in: <<http://cran.r-project.org/web/packages/lme4/index.html>> Access in: 10/14/14.
- Baxter, R. C. (2000). Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol-Endoc M*, 278, 6, E967-E976.
- Calder, M. D., Caveney, A. N., Westhusin, M. H., Watson, A. J. (2001). Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE2 induces moderate expansion of the bovine cumulus *in vitro*. *Biol Reprod*, 65, 135- 40.
- Calder, M. D., Caveney, A. N., Sirard, M. A., Watson, A. J. (2005). Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation *in vitro*. *Fertil Steril*, 83, 1077-1085.
- Conti, M., Hsieh, M., Park, J. Y., Su, Y. Q. (2006). Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol*, 20, 715-723.
- De Bem, T. H. C., Adona, P. R., Bressan, F. F., Mesquita, L. G., Chiaratti, M. R., Meirelles, F. V., Leal, C. L. V. (2014). The influence of morphology, follicle size, and Bcl-2 and Bax transcripts on the developmental competence of bovine oocyte. *Reprod Domestic Anim*, 49, 576-583.
- Del Collado, M., Saraiva, N. Z., Lopes, F. L., Cruz, M. H., Gaspar, R. C., Oliveira, C. S., Perecin, F., Garcia, J. M. (2014). Efeitos da redução ou substituição do soro fetal bovino por outros compostos na maturação *in vitro* de oócitos bovinos. *Pesquisa Vet Brasil*, 34, 7, 689-694.
- Fabian, D., Il'kova, G., Rehak, P., Czikkova, S., Baran, V., Koppel, J. (2004). Inhibitory effect of IGF-I on induced apoptosis in mouse preimplantation embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology*, 61, 745–755.
- Fair, T., Hyttel, P., Greve, T., Boland, M. (1996). Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. *Mol Reprod Dev*, 43, 4, 503-512.
- Francis, G. L., Ross, M., Ballard, F. J., Milner, S. J., Senn, C., Mcneil, K. A., Wallace, J. C., King, R., Wells, J. R. (1992). Novel recombinant fusion protein analogues of insulin-like growth factor (IGF)-I indicate the relative importance of IGF-binding protein and receptor binding for enhanced biological potency. *J Mol Endocrinol*, 8, 3, 213-223.
- Fortune, J. E., Rivera, G. M., Yang, M. Y. (2004). Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci*, 82-83, 109-126.
- Gardner, D. K., Lane, M. (2005). Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting. *Reprod Fertil Dev*, 17, 361–370.
- Jones, J. I. (1995). Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Ver*, 16, 3-34.

- Kane, M. T. Morgan PM, Coonan C. (1997). Peptide growth factors and preimplantation development. *Hum Reprod Update*, 3, 137-57.
- Katz-Jaffe, M. G., McCallie, B. R., Preis, K. A., Filipovits, J., Gardner, D. K. (2009). Transcriptome analysis of *in vivo* and *in vitro* matured bovine MII oocytes. *Theriogenology*, 71, 6, 939-946.
- Kiapekou, E., Loutradis, D., Drakakis, P., Zapanti, E., Mastorakos, G., Antsaklis, A. (2005) Effects of GH and IGF-I on the *in vitro* maturation of mouse oocytes. *Hormones*, 4, 3, 155-160.
- Kim, M. R., Tilly, J. L. (2004). Current concepts in Bcl-2 family member regulation of female germ cell development and survival. *Biochim Biophys Acta*, 1644, 205–210.
- Köle, S., Stojkovic, M., Boie, G., Wolf, E., Sinowatz, F. (2003). Growth hormone-related effects on apoptosis, mitosis and expression of connexin 43 in bovine *in vitro* maturation cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod*, 68, 1584-1589.
- Kuzmany, A., Havlicek, V., Wrenzycki, C., Wilkening, S., Brem, G., Besenfelder, U. (2011). Expression of mRNA, before and after freezing, in bovine blastocysts cultured under different conditions. *Theriogenology*, 75, 482-494.
- Liu, J., Sirois, J. (1998). Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. *Biol Reprod*, 58, 1527-1532.
- Magalhães, D. M., Sales, E. T., Padilha, R. T., Silva, T. F. P., Tonioli, R., Figueiredo, J. R. (2012). Hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I): importantes reguladores das foliculogêneses *in vivo* e *in vitro*. *Rev Bras Reprod Anim*, 36, 1, 32-38.
- Mamo, S., Carter, F., Lonergan, P., Leal, C. L. V., Naib, A. A., Mcgettigan, P., Mehta, J. P., Evans, A. C. O., Trudee, F. (2011). Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and *in vitro* matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. *BMC Genomics*, 12, 151, 1-14.
- Matwee, C., Betts, D. H., King, W. A. (2000). Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote*, 8, 57–68.
- Makarevich, A. V., Markkula, M. (2002). Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during *in vitro* maturation and culture. *Biol Reprod*, 66, 386–392.
- Meiyu, Q., Liu, D., Roth, Z. (2014). IGF-I slightly improves nuclear maturation and cleavage rate of bovine oocytes exposed to acute heat shock *in vitro*. *Zygote*, 29, 1-11.
- Mihm, M., Austin, E. J., Good, T. E. M., Ireland, J. L. H., Knight, P. G., Roche, J. F., Ireland, J. J. (2000). Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biol Reprod*, 63, 811-819.
- Monget, P., Fabre, S., Mulsant, P., Lecerf, F., Elsen, J. M., Mazerbourg, S., Pisselet, C., Monniaux, D. (2002). Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domest Anim Endocr*, 23, 139-154.
- Nuttinck, F., Reinaud, P., Tricoire, H., Vigneron, C., Peynot, N., Mialot, J. P., Mermillod, P., Charpigny, G. (2002). Cyclooxygenase-2 is expressed by cumulus cells during oocyte maturation in cattle. *Mol Reprod Dev*, 61, 93-101.
- Nuttinck, F., Charpigny, G., Mermillod, P., Loosfelt, H., Meduri, G., Freret, S., Grimard, B., Heyman, Y. (2004). Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. *Domest Anim Endocrin*, 27, 179-195.
- Patton, J., Kenny, D. A., Mcnamara, S., Mee, J. F., O'mara, F. P., Diskin, M. G., Murphy, J. J. (2007) Relationships among milk production, energy balance, plasma analytes, and reproduction in Holstein–Friesian cows. *J Dairy Sci*, 90, 649-658.

- Paulini, F., Melo, E. O. (2001). The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. *Reprod Domest Anim*, 46, 354-361.
- Pereira, G. R., Lorenzo, P. L., Carneiro, G. F., Ball, B. A., Gonçalves, P. B. D., Pegoraro, L. M., Bilodeau-Goeseels, S., Kastelic, J. P., Casey, P. J. Liu, I. K. (2011). The effect of growth hormone (GH) and insuline-like growth factor-I (IGF-I) on *in vitro* maturation of equine oocytes. *Zygote*, 20, 353-360.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- Prelle, K., Stojkovic, M., Boxhammer, K., Motlik, J., Ewald, D., Arnold, J. G., Wolf, E. (2001). Insuline-like growth fator I (IGF-I) and Long R3 IGF-I differently affect development and Messenger ribonucleic acid bundance for IGF-binding proteins and type I IGF receptors in *in vitro* produced bovine embryos. *Endocrinology*, 142,3, 1309-1316.
- Räty, M., Ketoja, E., Pitkänen, T., Ahola, V., Kananen, K., Peippo, J. (2011). In vitro maturation supplements affect developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes and embryo quality after vitrification. *Cryobiology*, 63, 3, 245-255.
- Rivera, G. M., Fortune, J. E. (2001). Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone-dependent insulin-like growth factor binding-protein-4 protease. *Biol Reprod*, 65, 112-8.
- Satrapa, R. A., Castilho, A. S., Razza, E. M., Pegorer, M. F., Puelker, R., Barros, C. M. (2013). Differential expression of members of the IGF system in OPU-derived oocytes from Nelore (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) cows. *Anim Reprod Sci*, 138, 155-158.
- Schams, D., Berisha, B., Kosmann, M., Amselgruber, W. M. (2002). Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. *Domest Anim Endocrin*, 22, 51-72.
- Silva, J. R. V., Figueiredo, J. R., Van Den Hurk, R. (2009). Involvement of growth hormone (GH) and insuline-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*, 71, 1193-1208.
- Sirard, M. A., Richard, F., Blondin, P., Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65, 126-136.
- Sirotkin, A. V., Bezáková, A., Laurincík, J., Matejovicová, B. (2011). Involvement of the metabolic hormones leptina, ghrelin, obestatin, IGF-I and MAP Kinase in control of porcine oocyte maturation. *Animal*, 5, 1, 94-99.
- Spicer, L. J. (2004). Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. *Biol Reprod*, 70, 1223-1230.
- Stewart, R. E., Spicer, L. J., Hamilton, T. D., Keefer, B. E., Dawson, L. J., Morgan, G. L. (1996). Levels of insulin-like growthfactor (IGF) binding proteins, luteinizing hormone and IGF-1 receptors, and steroids in dominant follicles during the first follicular wave in cattle exhibiting regular estrous cycls. *Endocrinology*, 137, 2842-50.
- Stinshoff, H., Wilkening, S., Hanstedt, A., Brüning, K., Wrenzycki, C. (2011). Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology*, 76, 1433-1441.
- Thomas, F. H., Campbell, B. K., Armstrong, D. G., Teler, E. E. (2007). Effects of IGF-I bioavailability on bovine preantral follicular development *in vitro*. *Reproduction*, 133, 1121-1128.

- Tremblay, K., Vigneault, C., McGraw, S., Morin, G., Sirard, M. A. (2006). Identification and characterization of a novel bovine oocyte-specific secreted protein gene. *Gene*, 375, 44-53.
- Velazquez, M. A., Newman, M., Christie, M. F., Cripps, P. J., Crowe, M. A., Smith, R. F., Dobson, H. (2005). The usefulness of a single measurement of insulin-like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a bovine MOET program. *Theriogenology*, 64, 1977-1994.
- Walters, K. A., Binnie, J. P., Campbell, B. K., Armstrong, D. G., Telfer, E. E. (2006). The effects of IGF-I on bovine follicle development and IGFBP-2 expression are dose and stage dependent. *Reproduction*, 131, 515-23.
- Wang, T. H., Chant, C. L., Wu, H. M., Chiu, Y. M., Chen, C. K., Wang, H. S. (2005). Insuline-like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-4 in follicular fluid are associated with oocyte maturation and embryo development. *Fertil Steril*, 86, 5, 1392-1401.
- Warzych, E., Peippo J, Szydlowski M, Lechniak D. (2007a). Supplements to *in vitro* maturation media affect the production of bovine blastocysts and their apoptotic index but not the proportions of matured and apoptotic oocytes. *Anim Reprod Sci*, 97, 3-4, 334-343.
- Warzych E, Wrenzycki C, Peippo J, Lechniak D. (2007b). Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced in vitro. *Mol Reprod Dev*, 74, 280-289.
- Wasielak, M., Bogaki, M. (2007). Apoptosis inhibition by Insuline-Like Growth Factor (IGF)-I during in vitro maturation of bovine oocytes. *J Reprod Dev*, 53, 2, 419-426.
- Watson, A. J. (2007) Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J Anim Sci*, 85, E1-E3.
- Yang, M. Y., Rajamahendran, R. (2002). Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Anim Reprod Sci*, 70, 159-169.
- Yuan, Y. Q., Van Soom, A., Leroy, J. M. L. R., Dewulf, J., Van Zeveren, A., De Kruif, A., Peelman, L. J. (2005). Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology*, 63, 2147-2163.
- Zhandi, M., Towhidi, A., Nasr-Esfahani, M. H., Eftekhari-Yazdi, P., Zare-Shahneh, A. (2009). Unexpected detrimental effect of insulin like growth factor-1 on bovine oocyte developmental competence under heat stress. *J Assist Reprod Genet*, 26, 605-11.
- Zhou, J., Bievre, M., Bondy, C. A. (2000). Reduced GLUT 1 expression in IGF1-/- null oocytes and follicles. *Growth Horm IGF Res*, 10, 111-117.

ANEXO

LISTA DE PRODUTOS UTILIZADOS

- 1.** Dullbecco Modificado Flush (DMPBS), Nutricell, Campinas, SP, Brasil.
- 2.** Álcool Polivinílico (PVA), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, cat. P8136.
- 3.** TCM Hepes, Gibco, Langley, OK, EUA, cat. 12340-03.
- 4.** Placa de Petri 60x16 mm, TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça, cat. 93060.
- 5.** Óleo mineral estéril, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, cat. M8410-1L.
- 6.** IGF-Long R3, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, cat. I1271-0.
- 7.** TCM 199, Gibco, Langley, OK, EUA, cat. 11150-059.
- 8.** Piruvato, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, cat. P3662-25G.
- 9.** FSH, Folltropin-V®, Bioniche, Belleville, Ontário, Canadá.
- 10.** LH, Lutropin-V®, Bioniche, Belleville, Ontário, Canadá.
- 11.** Estreptomicina e Penicilina, Gibco, Langley, OK, EUA, cat.15140-122.
- 12.** IGF-1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, cat. SRP3069.
- 13.** In situ cell death detection kit fluorescein, Roche®, cat.11684795910.
- 14.** Hoechst 33342, Invitrogen, São Paulo, Brasil, cat. H1399.
- 15.** Polivinilpirrolidona (PVP), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, cat. P0930.
- 16.** 8% paraformaldehyde, EMS, Hatfield, Filadélfia, EUA, cat. 157-8.
- 17.** Triton X-100, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, cat. T8787.
- 18.** Citrato de sódio, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, cat. S4641.
- 19.** DNase I – Amplification Grade, Invitrogen, São Paulo, Brasil, cat. 18068-015.
- 20.** RNeasy Mini Kit®, Qiagen, Mississauga, Ontário, Canadá, cat. 74104.
- 21.** SuperScript III Reverse Transcriptase®, Invitrogen, São Paulo, Brasil, cat. 18080-051.
- 22.** RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor®, Invitrogen, São Paulo, Brasil, cat.10777-019.
- 23.** Power SYBR®Green PCR Master Mix, Applied Biosystem, São Paulo, Brasil, cat. 4368702.
- 24.** High Capacity cDNA Archive Kit, Life Technologies Corporation, Carlsbad®, CA, EUA, cat. 4322171.