UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO* NA PRESENÇA DE IGF-1, GH E INSULINA NOS MEIOS DE MATURAÇÃO DE OVÓCITOS E CULTIVO EMBRIONÁRIO

CARLA BIANCHINI PONCHIROLLI

BOTUCATU - SP
SETEMBRO 2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO* NA PRESENÇA DE IGF-1, GH E INSULINA NOS MEIOS DE MATURAÇÃO DE OVÓCITOS E CULTIVO EMBRIONÁRIO

CARLA BIANCHINI PONCHIROLLI

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre

Orientador: Professora Adjunto Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga

BOTUCATU – SP

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Ponchirolli, Carla Bianchini.
Desenvolvimento de embriões bovinos *in vitro* na presença de IGF-1, GH e Insulina nos meios de maturação de ovócitos e cultivo embrionário / Carla Bianchini Ponchirolli. – 2006.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.
Orientador: Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga
Assunto CAPES: 50504002

1. Bovino - Reprodução

CDD 636.20898

Palavras-chave: Bovinos; Embriões; GH; IGF-1; Insulina

“Aos meus pais”

Agradeço

A minha orientadora e amiga Professora **Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga**, por estar sempre ao meu lado, ajudando em minha formação profissional e pessoal e apoiando nos momentos de dificuldades com uma palavra de sabedoria e carinho, presente também nos momentos mais felizes e importantes de minha vida. Fê, muito obrigada!

À minha **família**, que sempre me apóia e torce por meu sucesso, que está ao meu lado, haja o que houver, que me acolhe e me dá alegrias. **Pai, mãe, Cesar**, obrigada pelo amor que me dedicam!

Ao **Michael**, meu namorado, pelo amor e paciência.

Aos meus amigos, que com alegria, estão sempre presentes. Obrigada pela força e companheirismo.

Aos colegas e amigos do laboratório, pois sem seu apoio esse trabalho não teria sido concluído. **Cláudia, Elen, Patrícia, João** e todos os outros, muito obrigada.

Às amigas **Camila, Lílian**, por terem ajudado diretamente na realização desse trabalho.

Aos colegas **Gustavo** e **Aila Loise,** pela ajuda com a análise estatística.

Aos professores do **Departamento de Reprodução Animal** da FMVZ, UNESP, Botucatu.

A todos os funcionários da FMVZ, aos funcionários do Departamento **de Reprodução Animal**, às funcionárias da **Biblioteca**, aos funcionários do Frigorífico **Frigol**.

A **FAPESP** pelo apoio financeiro.

Resumo

PONCHIROLLI, C.B. Desenvolvimento de embriões bovinos *in vitro* na presença de IGF-1, GH e Insulina nos meios de maturação de ovócitos e cultivo embrionário. (*In vitro* development of bovine embryos in presence of IGF-1, GH and Insulin at oocyte maturation medium and embryo culture medium). Dissertação mestrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, 2006.

As técnicas de produção *in vitro* de embriões bovinos ainda precisam ser melhoradas em relação às taxas de embriões produzidos e sua qualidade. A adição de fatores de crescimento aos meios de cultivo de embriões bovinos tem sido estudada, com o intuito de melhorar a produção e a qualidade embrionária. O objetivo deste experimento foi testar a adição de GH, IGF-1 e Insulina em duas etapas do processo de produção *in vitro*: na maturação dos ovócitos e no cultivo dos embriões, visando aumentar as taxas de produção de blastocistos e a qualidade dos embriões produzidos, além de verificar a viabilidade de uma coloração com acridina orange e iodeto de propídeo para avaliação da qualidade dos embriões. No experimento 1, avaliou-se as taxas de clivagem e formação de blastocistos após maturação ovocitária em meio 199 (sais de Earle e L-glutamina e 2,2 mg/ml de bicarbonato de sódio, *médium* 199*,* Sigma, Saint Louis, EUA, # M-4530), na presença de 10% de SFB, de sódio, 1 mg/ml de 17β estradiol (E_2 – Sigma, Saint Louis, EUA, # E-2758), 50μg/ml de hCG (Profasi® 5.000UI), 5μg/ml de FSH (Folltropin-V®, Vetrepharm, Ontário, Canadá), e 75μg/ml de sulfato de gentamicina, suplementado com IGF-1 , GH, Insulina, adicionados separadamente ou em conjunto. No experimento 2 foram avaliadas as taxas de clivagem e formação de blastocistos em meio composto por HTF (Human Tubal Fluid, HTF®,

Irvane) e BME (Basal Medium Eagle, BME®, Sigma, Saint Louis, EUA), na proporção de 1:1 (HTF:BME) acrescido de 0,6% de BSA, 0,01% de Mioinositol e 75 μg/ml de gentamicina, incubados em estufa a 38, 5°C, a 5% de CO_2 e umidade absoluta, com suplementação de 10% de SFB no dia 3 de cultivo. O meio foi suplementado com IGF-1, GH, Insulina,adicionados separadamente ou em conjunto. No experimento 3, a coloração com acridina orange e iodeto de propídeo foi testada para avaliar a qualidade das estruturas produzidas. A contagem e a porcentagem de células com fragmentação de DNA foram os parâmetros avaliados para avaliação da qualidade das mórulas. Nos experimentos 1 e 2, não houve diferença estatística entre os grupos, quanto a taxa de produção de blastocistos após suplentação dos meios de maturação oocitária e cultivo de embriões. No experimento 3, a técnica de coloração com acridina orange e iodeto de propídeo mostrou-se eficiente ao evidenciar a fragmentação de DNA para avaliação da qualidade. A adição de hormônios e fator de crescimento ao meio de maturação *in vitro* de oócitos não melhorou a qualidade dos embriões produzidos, mas o grupo com adição de insulina ao meio de cultivo embrionário apresentou índice elevado de fragmentação de DNA, indicando qualidade inferior dos embriões produzidos, em relação aos demais grupos.

Palavras-chave: IGF-1, GH, Insulina, maturação *in vitro,* cultivo *in vitro,* bovino.

Abstract

In vitro embryo production techniques in bovines still need to be improved due to the embryo production rate and the quality. The addition of growth factors to the bovine embryo culture medium has been studied due to their effects on the production and embryo quality. The objective of this experiment was to study the addition of GH, IGF-1 and Insulin at two steps of the in vitro embryo production such as oocyte maturation and embryo culture, aiming at to increase the blastocysts rates as well their quality, as evidenced by the viability after staining with acridine orange and propideium iodete. In experiment 1, the cleavage rate and blastocyst production were evaluated after oocyte maturation in medium 199 with Earle's salt, L-glutamine and 2.2 mg/ml sodium bicarbonate, medium 199, Sigma, Saint Louis, USA, # M-4530) plus 10% BFS, 50 µg /ml sodium piruvate, 1 mg/ml estradiol 17 β (E2 - Sigma, Saint Louis, USA., # E-2758), 50µg/ml hCG (Profasi® 5.000UI), 5 µg/ml FSH (Foltropin-V®, Vetrepharm, Ontário, Canada), and 75µg/ml gentamicin sulfate, supplemented either with IGF-1, GH, Insulin alone or in combination. In experiment 2, the cleavage rate and blastocyst formation were evaluated after in vitro embryo culture in HTF (Human Tubal Fluid, HTF ®, Irvane) and BME (Basal Medium Eagle, BME ®, Sigma), in 1:1 proportion (HTF: BME) plus 0.6% of BSA, 0.01% of Mioynositol and 75 µg/ml of gentamicin sulfate, at 38, 5ºC, 5% of CO_2 and absolute humidity atmosphere, supplemented with 10% FCS at day 3 of culture. The medium was supplemented with IGF-1, GH, Insulin alone or in combination. In experiment 3, the acridine orange and propideium iodete stain was used to evaluate the quality of produced morulae produced as in experiment 1 or 2.

The number and percentage of cells with DNA fragmentation was used to determine marulae quality. The rate of blastocyst production in experiment 1 or 2 was not statistical different among the groups after addition of hormones and growth factor to in vitro oocyte maturation or embryo culture media. In experiment 3, the acridine orange and propidium iodete staining was efficient in determine the cell number and DNA fragmentation for quality evaluation of early bovine embryos. The addition of hormones and growth factor to in vitro oocyte maturation medium did not improve the quality of produced morulae. On the other hand, the addition of insulin to embryo culture medium led to high DNA fragmentation rate, harming the morulae quality as compared to the other groups.

Key word: IGF-1, GH, Insulin, in vitro maturation, in vitro culture, bovine.

Sumário

1. Introdução 12

2. Revisão de literatura 15

2.1 Maturação oocitária 15

2.2 Influência do GH, IGF-1 e Insulina na maturação oocitária e desenvolvimento embrionário. 16

2.3 Morte celular durante o desenvolvimento embrionário 21

2.4 Influência GH, IGF-1 e Insulina na qualidade embrionária. 24

3. Objetivos 28

4. Material e métodos 30

4.1. Produção *in vitro* dos embriões 30

4.2. Análise estatística 37

5. Resultados 39

5.1 Experimento 1 39

5.2 Experimento 2 40

5.3 Experimento 3 41

6. Discussão 49

7. Conclusão 59

8. Referências 62

9. Anexos 75

Anexo A 76

Anexo B 77

Anexo C 79

Introdução

1- Introdução

A produção *in vitro* (PIV) de embriões ainda é bastante limitada, principalmente em função dos resultados obtidos em relação ao índice de produção e qualidade de mórulas e blastocistos, além das taxas de mortalidade embrionária mais elevadas em relação a transferência de embriões e a baixa congelabilidade dos embriões produzidos *in vitro.*.

O desenvolvimento embrionário *in vitro* é potencialmente afetado por vários fatores, incluindo o sistema de cultivo, a quantidade de ovócitos ou embriões nos grupos de maturação e cultivo e a presença de soro e/ou fatores de crescimento (embriotróficos) de ação parácrina e autócrina nos meios. Para que haja melhor controle de qualidade e a possibilidade de comparação de resultados entre os diferentes laboratórios, é imprescindível a otimização de meios quimicamente definidos para o cultivo. Porém, de maneira geral, o cultivo embrionário em meios quimicamente definidos apresenta baixos índices de produção de blastocistos.

Para a ocorrência da fertilização e desenvolvimento embrionário inicial, é fundamental que o ovócito tenha sofrido completa maturação, já que ele desempenha papel crucial no intervalo entre a fertilização e a chamada “transição materna - embrionária”, tornando o genoma do embrião funcional. *In vitro*, hormônios como o LH, o FSH e estrógeno são freqüentemente utilizados em meios de maturação de ovócitos, para promover o processo de maturação. Porém, a foliculogênese e a maturação ovocitária são reguladas não somente pelas gonadotrofinas e esteróides, mas também por outros hormônios, como o hormônio de crescimento (GH) e fatores de crescimento, como o fator de crescimento semelhante a insulina (“insulin- like growth facto”r, IGF-1).

Hormônios como o GH e a Insulina ou fatores de crescimento também têm sido adicionados aos meios de cultivo de embriões mamíferos pré - implantação. A suplementação tanto do meio de maturação de ovócitos, quanto do meio de cultura de embriões com GH ou IGF-I, por exemplo, tem mostrado um efeito benéfico no desenvolvimento do embrião antes da implantação, estimulando a proliferação celular e inibindo a ocorrência de apoptose. Porém, a literatura é bastante controversa em relação à influência dessas substâncias no desenvolvimento de embriões.

Desta forma, o objetivo deste experimento foi o de estudar o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos na presença GH, IGF-I e insulina em duas etapas do processo de produção *in vitro*: na maturação dos ovócitos e no cultivo embrionário.

Revisão

2. Revisão de literatura

2.1-Maturação ovocitária:

Nos mamíferos, os oócitos inclusos em folículos estão bloqueados no estágio de diplóteno da prófase da primeira divisão meiótica (TSAFRIRI, 1985). *In vivo*, a maturação nuclear resultando em metáfase II (M II) é estimulada pela onda pré- ovulatória de LH. Porém, os mecanismos intrafoliculares não são bem conhecidos (MATTIOLI, 1992).

A maturação coincide com o final do desenvolvimento folicular e inclui dois eventos celulares: a finalização do processo de meiose, desde o estágio de vesícula germinativa até a formação da segunda placa metafásica (metáfase II) e a maturação citoplasmática, onde alterações moleculares e estruturais conferem ao ovócito maduro a capacidade de suportar a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial (BEVERS *et al*. 1997). Algumas dessas alterações incluem a redistribuição de organelas celulares, como grânulos corticais (CGs), mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático, além da habilidade do ovócito em sofrer exocitose dos CGs (DUCIBELLA *et al*, 1990; 1993). Além disso, o ovócito adquire a capacidade de descondensar a cromatina do espermatozóide após a fertilização (USUI e YANAGIMACHI, 1976).

O terceiro aspecto da maturação é a maturação molecular. Em ratos, o genoma do embrião controla o desenvolvimento embrionário inicial imediatamente após a fertilização, logo após o estágio de duas células. Em grandes animais, essa transição ocorre ao redor do quarto ciclo celular (FIRST *et*

al..1988). O ovócito deve conter as instruções apropriadas para dirigir as primeiras divisões e a ativação do genoma embrionário, portanto, o desenvolvimento embrionário inicial está sob controle do mRNA citoplasmático acumulado durante a oogênese (SIRARD, 2001).

In vitro, hormônios como LH, FSH e estrógeno são freqüentemente utilizados como aditivos em meios de cultura para melhorar a qualidade do processo de maturação (FUKUI *et al.*, 1982; KEEFER *et al.*, 1993; YOUNIS *et al.*, 1989; ZUELKE e BRACKETT, 1990).

A suplementação dos meios de maturação com esses hormônios origina-se a partir do conhecimento de seus envolvimentos no processo de maturação *in vivo*. Porém, a foliculogênese e a maturação ovocitária são reguladas não somente pelas gonadotrofinas e esteróides, mas também por outros hormônios, como o hormônio de crescimento e uma variedade de citocinas produzidas localmente e de ação parácrina. Entre estes reguladores, há vários fatores de crescimento, como os fatores de crescimento semelhantes a insulina (“insulin- like growth factors”, IGFs), fator de crescimento epidermal (“epidermal growth facto”r, EGF), entre outros. (BEVERS *et a.l*, 1997).

2.2- Influência GH, IGF-1 e Insulina na maturação ovocitária e desenvolvimento embrionário.

O hormônio de crescimento estimula a proliferação e diferenciação em uma grande variedade de tipos celulares, inclusive no tecido ovariano. Em muitos tecidos, o GH exerce seu efeito parcialmente através da produção de IGF-1. De

fato, a produção ovariana de IGF-1 parece estar sob controle do GH em presença de gonadotrofinas (CHUN *et al*., 1994).

O RNA mensageiro para receptores de GH já foi identificado em células do *cumulus* e células da granulosa de folículos bovinos, além de ovócitos bovinos (YZADYAR *et al.*, 1997, KOLLE *et al.*, 1998) e precocemente em embriões no estágio de uma célula (IZADYAR *et al*., 2000).

O tratamento de vacas superovuladas com GH no momento da inseminação diminuiu o número de ovócitos não fertilizados na coleta de embriões e aumentou a porcentagem de embriões transferíveis, além da porcentagem de embriões em estágios mais avançados de desenvolvimento (MOREIRA *et al*., 2000), sugerindo a influência do GH na fertilidade desses animais.

O envolvimento do GH na regulação do crescimento e desenvolvimento folicular tem sido relatado (GONG *et al*., 1993; WEBB *et al.*, 1994). A maturação de COCs em meio livre de soro, suplementado com bGH acelerou a progressão da meiose, induziu a expansão do *cumulus* (menos que o FSH) e aumentou as taxas de clivagem e número de blastocistos após a fertilização *in vitro* e o cultivo *in vitro* (IZADYAR *et al*., 1996). A aceleração da maturação nuclear pelo GH também foi observada durante a maturação *in vitro* de ovócitos de rato (APA *et al.*, 1994) e suínos (HAGEN *et al*., 1990). A inibição da quebra da vesícula germinativa foi obtida quando ovócitos desnudos foram cultivados na presença de GH bovino. O efeito oposto do GH em ovócitos desnudos indica que a aceleração da maturação é exercida através da ação do GH nas células do *cumulus* (IZADYAR *et al*., 1996).

A detecção por RT-PCR de mRNA para receptores de GH nas células do *cumulus* e no ovócito, sustenta o envolvimento do GH na maturação em ovócitos

bovinos. Possivelmente, o aumento nas taxas de clivagem e formação de blastocistos é causado pelo efeito positivo do GH na cinética da maturação nuclear e extrusão do primeiro corpúsculo polar. Ovócitos cuja extrusão do corpúsculo ocorre logo após o início da maturação apresentam maior porcentagem de clivagem e formação e blastocisto, quando comparados com aqueles que sofreram extrusão do corpúsculo polar em um estágio mais tardio. (VAN DER WESTERLAKEN *et al*., 1994). Izadyar *et al.*, (1996) notaram que a proporção de ovócitos em MII após 24 horas de cultivo não era afetada pelo acréscimo de GH, assumindo-se que a aceleração da extrusão do primeiro corpúsculo polar reflete o aumento da taxa de maturação citoplasmática, levando a maior formação de blastocistos.

Recentemente, um estudo realizado com embriões bovinos (MOREIRA *et al.,*2002) demostrou que a adição de GH ao meio de maturação *in vitro* de ovócitos levou a um aumento nas taxas de clivagem e promoveu o desenvolvimento embrionário, resultando em aumento do número de blastocistos em estágios mais avançados de desenvolvimento. Os efeitos do GH no desenvolvimento embrionário foram observados independentemente da adição exógena de IGF-1 (MOREIRA *et al.,* 2002).

O IGF-1 é relatado como estimulador da maturação ovocitária e subseqüente desenvolvimento embrionário em bovino (MATSUI *et al*., 1995 PALMA *et al.,* 1997), suíno (XIA *et al*., 1994), coelho (HERRLER *et al*., 1998), rato (O'NEILL, 1997) e humano (LIGHTEN *et al*., 1998;). No embrião, este fator é estimulador da proliferação celular (HERRLER *et al*., 1998; LIGHTEN *et al.*, 1998;

DOHERTY *et al*., 1994) e supressor da apoptose (HERRLER *et al*., 1998; SPANOS *et al*., 2000).

É conhecido como potente mitógeno para as células da granulosa (HERNÁNDEZ *et al*, 1988), mesmo na ausência de FSH (VELDHUIS *et al*, 1986). Além disso, os folículos ovarianos têm sido reconhecidos como um sítio importante para a ação do IGF-I, por expressarem quantidade considerável de receptores para esse fator de crescimento (SPICER e ECHTERNKAMP, 1995).

In vivo, o IGF-1 materno está presente no fluido folicular (SPICER E ECHTERNKAMP, 1995) e em secreções uterinas (GEISERT *et al*., 1991) e de tuba uterina (SCHIMIDT *et al.*, 1994), fornecendo um ambiente rico em IGF-1 para o ovócito e posteriormente, para o embrião (WATSON *et al*, 1999).

Quanto à maturação *in vitro*, Herrler *et al.* (1992) mostraram que a adição de IGF- 1 ao meio de maturação melhorou a qualidade dos embriões bovinos e também aumentou a taxa de produção de blastocistos (MARKKULA e MAKAREVICH, 2001). Rieger *et al.* (1998) observaram que o IGF-1, em associação ao EGF, aumentaram significativamente as taxas de clivagem quando os oócitos foram maturados em meio suplementado com esses fatores.

Além do envolvimento com a maturação, o GH e IGF-I devem influenciar o desenvolvimento embrionário inicial, já que mRNA para receptores de GH e IGF-I foram identificados em embriões em desenvolvimento, desde o estágio de uma célula (IZADYAR *et al.,* 2000; WATSON *et al*., 1992). A adição de GH e IGF-1 ao meio de cultivo de embriões bovinos estimulou a proporção de ovócitos que se desenvolveram ao estágio de blastocisto, além de acelerar a taxa de desenvolvimento embrionário (MOREIRA *et al.,* 2003).

A insulina também promove o desenvolvimento embrionário inicial (HERRLER *et al*, 1998). Receptores para insulina foram encontrados em embriões de ratos (HARVEY *et al*, 1991; ROSENBLUM *et al*., 1986) e bovinos (WATSON *et al*, 1992). A insulina estimula a síntese protéica em embriões de ratos (SHIN et *al*, 1992) e suíno (SAITO *et al*, 1991) e a formação de blastocistos (HARVEY *et al*, 1988; SHIN *et al*, 1992). Estudos realizados demonstram que a insulina e o IGF-1 apresentam efeitos benéficos similares no desenvolvimento embrionário inicial *in vitro*, sugerindo que esse efeito deve ser mediado por uma reação cruzada com seus receptores (MATSUI *et al.*, 1995).

Os efeitos do IGF-1 no desenvolvimento embrionário pré-implantação são mediados por receptores com elevada afinidade para este fator de crescimento (MATSUI *et al.,* 1997).

Em um experimento realizado com bovino, Makarevich e Markkula (2002) demonstraram que a adição de IGF-1 ao meio de cultivo não aumentou a taxa de clivagem, mas a produção de mórulas tardias e blastocistos aumentou significativamente.

A adição de IGF-1 na concentração de 5 ng/ml a um meio de cultivo *in vitro* quimicamente definido não apresentou efeitos benéficos à porcentagem de produção de blastocistos (HERNADEZ-FONSECA *et al*., 2002). Porém, em estudo mais recente, a suplementação de um meio de CIV quimicamente definido (com PVA substituindo o BSA) com a mesma concentração de IGF-1 (5 ng/ml) foi benéfica para aumentar as taxas de produção embrionária em bovinos, sem aumentar o índice de clivagem, que reflete a capacidade de fertilização e

geralmente, não é afetado por fatores de crescimento adicionados aos meios de cultivo (SIRISATHIEN *et al*, 2003).

Apesar de embriões poderem ser cultivados em meios simples, sob condições definidas (ECKERT e NIEMANN, 1995; GRAHAM *et al.,* 1995; HOLM *et al.*, 1999), a ausência dessas fontes protéicas leva a produção de embriões com menor capacidade de desenvolvimento (THOMPSON *et al.,* 1998) e menor número de células (LEE *et al*., 1998; PINYOPUMMINTR e BAVISTER, 1994). A utilização de soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA) no meio de cultivo de embriões tem se mostrado benéfica ao desenvolvimento embrionário (GÓMEZ e DÍEZ, 2000), levando a taxas de produção bastante elevadas. A explicação deve-se ao fato de que o soro suporta o embrião com nutrientes essenciais e fatores de crescimento (VAN LANGENDONCKT *et al.,* 1997) com efeitos embriotróficos (BAVISTER, 1992), além de suas benéficas propriedades antioxidantes (RIEGER, 1992).

2.3- Morte celular durante o desenvolvimento embrionário

O desenvolvimento embrionário é caracterizado por uma progressão de eventos ordenados, incluindo divisão, diferenciação e morte celular.

Vários tipos de morte celular têm sido estudados e relacionados, porém a definição de apoptose ficou clara por Kerr *et al.* (1972) apud Fabian *et al.* (2005).

Apoptose ou morte celular programada está presente durante o desenvolvimento embrionário de mamíferos, pois exerce o importante papel de eliminar células anormais e controlar o número de células em desenvolvimento. (FABIAN *et.al*., 2005). Tanto a massa celular interna quanto o trofoblasto sofrem

apoptose durante o desenvolvimento e a morte celular pode ocorrer em embriões prodizidos *in vivo* ou *in vitro* (HARDY, 1997). A maioria das ocorrências de morte celular no embrião são por apoptose, que é um processo comumente observado em tecidos onde ocorrem altas taxas de mitose e células com relativamente pouco citoplasma (ZAKERI *et.al*., 2002)

Erros no processo de apoptose do embrião resultam no comprometimento da futura maturação e podem levar a morte embrionária precoce ou á formação de anomalias fetais.

Como citadas por Fabian *et al*. (2005), existem diversas causas de apoptose em células embrionárias: anormalidades cromossômicas, exposição a fatores deletérios, como espécies oxigênio – reativas (ROS), irradiação por luz ultra-violeta, choque térmico, entre outras. A incidência de apoptose em embriões produzidos *in vitro* pode aumentar em condições inadequadas de cultivo, resultando da composição imprópria do meio de cultivo (LEVY, 2001) ou densidade embrionária inadequada na cultura (O'NEIL, 1998).

Apoptose geralmente ocorre em células isoladas (NEUBER *et al*., 2002) e é caracterizada pela perda da aderência da célula em apoptose com aquelas que a circundam. Ocorrem condensação e marginalização da cromatina, seguida de sua fragmentação. Bioquimicamente, proteínas são degradadas e o DNA é fragmentado por diferentes nucleases. O processo é seguido pela fragmentação da célula e formação de corpos apoptóticos circundados por uma membrana celular, os quais sofrerão fagocitose pelas células vizinhas, sem associação á inflamação (HARDY, 1997; 1999; HUPPERTZ, 1999).

Necrose é um diferente tipo de morte celular, que difere da apoptose em vários aspectos, pois usualmente envolve um grupo celular e não células isoladas, após exposição a injúria severa. A necrose caracteriza-se por lise e extravasamento dos componentes celulares (NEUBER *et al*., 2002), incluindo pirógenos que levam a inflamação tecidual. Durante o desenvolvimento embrionário, esse tipo de morte celular em grupo raramente ocorre (ZAKERI *et.al.,* 2002).

O número de células em apoptose tende a aumentar conforme o desenvolvimento embrionário prossegue e a taxa de mitose diminui (VAN SOOM *et al*., 2002). A morte celular programada está envolvida no processo de degeneração de embriões anormais durante o segundo ciclo celular em humanos (JURISICOVA *et al*., 1996) e durante o primeiro ciclo celular em embriões de ratos (JURISICOVA *et al*., 1998).

Em embriões de bovinos, a ocorrência da morte celular programada depende do estágio de desenvolvimento. Geralmente, a apoptose é observada em embriões após o estágio de oito a 16 células (FREI *et al*., 1989), mórulas e blastocistos. Porém, não é observada em zigotos (2 pró-núcleos) e embriões de duas ou três a sete células (MATWEE *et al*., 2000). Além disso, a porcentagem de núcleos com fragmentação de DNA diminui na fase de mórula, mas aumenta novamente durante a fase de blastocisto (BYRNE *et al.,* 1999).

O número de células embrionárias e a taxa de apoptose são indicadores da qualidade embrionária, pois quanto maior o número de blastômeros e menor a quantidade de células em apoptose, melhor a qualidade do embrião.

Em um embrião em desenvolvimento, células em apoptose são geralmente circundadas por inúmeras células em divisão e diferenciação, tornando difícil sua identificação. Há um grande número de métodos disponíveis para avaliação da apoptose embrionária, inclusive técnicas de coloração específicas (ZAKERI *et al.,* 2002).

A coloração com acridina “orange”*,* quando bem empregada, mostra-se bastante efetiva. Esse método de coloração é indicado para embriões pequenos ou em estágios iniciais de desenvolvimento (ZAKERI *et al.,* 2002).

A acridina interage com o DNA celular e o faz refletir a coloração verde, mas também interage com o RNA, porém este reflete a cor alaranjada. Sendo assim, uma célula corada com acridina “orange” terá o citoplasma vermelho-alaranjado e o núcleo verde, sendo ela viável ou não. A interpretação da morfologia da cromatina é importante para a determinação das células em apoptose ou não (COLIGAN *et al.,* 1992). A associação da acridina “orange” com iodeto de propídeo, o qual tem capacidade de penetrar células mortas, faz com que células vivas possam ser diferenciadas das mortas.

2.4 Influência do GH, IGF-1) e Insulina na qualidade embrionária.

A quantidade de células embrionárias e a taxa de ocorrência de morte celular são fortes indicativos da qualidade de embriões produzidos *in vitro.* O GH, IGF-1 e a insulina, muitas vezes, estimulam a proliferação celular, aumentando a taxa de produção embrionária *in vitro.*

Alguns autores demonstraram que o GH não só aumenta a taxa de produção embrionária, como promove o aumento no número de células dos

blastocistos (MOREIRA *et al.,* 2002). Em outro estudo, a adição de GH a um meio de cultivo embrionário livre de soro fetal levou a produção de embriões com quantidades de células significativamente superiores aos embriões produzidos no grupo controle, sem adição de GH. Além disso, esses embriões foram submetidos a vitrificação e apresentaram maiores taxas de sobrevivência a criopreservação, outro indicativo da superior qualidade dos embriões cultivados na presença de GH (MTANGO *et al*., 2003). Porém esses mesmos autores não observaram efeitos benéficos da adição da insulina na qualidade de embriões PIV (produzidos *in vitro).*

Há muitas evidências de que o GH pode agir como fator de sobrevivência ou anti-apoptótico para diferentes tipos celulares, tanto *in vivo*, quanto *in vitro* (SEGARD *et al*., 2003; DALLA LIBERA *et al.,* 2004) e que esses efeitos são observados em estágios bastante iniciais do desenvolvimento, como no oócito ou durante o desenvolvimento embrionário (SIROTKIN e MAKAREVICH, 1999; KOLLE *et al*., 2003).

Vários estudos demonstraram que o IGF-1 pode estimular a proliferação celular da massa celular interna e conseqüentemente, aumentar o número de células do embrião (HARVEY e KAYE, 1992; DOHERTY *et al*,1994). Porém, alguns autores não observaram esse efeito benéfico do IGF-1 na formação de blastocistos (SMITH *et al.,* 1993).

O IGF-1 também pode estar envolvido na proteção contra a morte celular em embriões. Seu efeito anti-apoptótico foi estudado em vários tecidos ou em células totipotentes, incluindo embriões pré-implantação. O IGF-1 protege contra apoptose espontânea ou induzida em células somáticas (GROTHEY *et al*, 1999).

O cultivo de embriões *in vitro* de várias espécies, como humanos (O'NEIL 1997; SPANOS *et al.,* 2000), bovinos (BYRNE *et al.*, 2002) e ratos (MAKAREVICH *et al.*, 2002) na presença de IGF-1 em diferentes concentrações, demonstrou a diminuição na incidência de apoptose espontânea. O efeito inibitório do IGF-1 ou da insulina na apoptose foi relatado em embriões do coelho, que tiveram morte celular induzida pela radiação UV (HERRLER *et al.*, 1998). Nesse mesmo estudo, os autores também observaram um aumento significativo na proliferação celular, diâmetro embrionário e formação de blastocistos.

Fabian *et al.* (2004) testaram o efeito inibitório de apoptose do IGF-1, cultivando embriões de ratos na presença desse fator de crescimento. Os embriões haviam sido induzidos à apoptose com Actinomicina D e Anfotericina, dois conhecidos indutores da morte celular e o IGF-1 mostrou-se benéfico na redução do índice de morte celular tanto em embriões tratados, como em embriões do grupo controle, que não tinham sido induzidos à apoptose.

Em cultivo de embriões partenotos de suínos a adição de IGF-1 a um meio quimicamente definido não aumentou a taxa de embriões que se desenvolveram do estágio de duas células até blastocistos, porém a utilização do IGF-1 na presença de BSA demonstrou efeito benéfico do IGF-1 em aumentar o número de células por embrião, além de reduzir significativamente o índice de apoptose, sugerindo um efeito sinérgico do IGF-1 e BSA em estimular a mitose celular e inibir a apoptose de partenotos na espécie suína (CUI *et al.*, 2005).

Objetivos

3- Objetivos

-Estudar os efeitos da influência da adição de GH, IGF-1 e Insulina ao meio de maturação de ovócitos, determinando o índice de desenvolvimento embrionário após a fertilização de ovócitos, bem como a qualidade dos embriões formados utilizando como parâmetros a contagem do número total de células e o índice de células com fragmentação do DNA.

-Estudar os efeitos da influência da adição de GH, IGF-1 e Insulina ao meio de cultivo embrionário, determinando o índice de formação de blastocistos, bem como a qualidade dos embriões formados (número de células e porcentagem de células com DNA fragmentado).

- Testar a eficiência da coloração de embriões bovinos com acridina “orange” e iodeto de propídeo para avaliação da qualidade embrionária (contagem de núcleos e fragmentação de DNA).

4- Material e métodos

4.1. Produção *in vitro* dos embriões.

Foram utilizados ovários bovinos provenientes do Frigorífico Frigol, situado no município de Lençóis Paulista – SP, a 50km de distância do laboratório. Os ovócitos foram aspirados de folículos com 2 a 8mm de diâmetro e mantidos no próprio fluido folicular, em tubos cônicos de 15mL aquecidos à 37ºC, até o momento da seleção. Para classificação e seleção dos ovócitos estes foram transferidos para placas de Petri contendo fluido folicular bovino previamente centrifugado e filtrado em filtro de 0,22µm e analisados sob microscópio estereoscópio. Foram selecionados para o uso somente ovócitos que apresentavam três ou mais camadas compactas de células do cumulus, citoplasma homogêneo e aspecto esférico. Ovócitos com cumulus expandido, desnudos ou com citoplasma muito claro e alterações de formato foram descartados. Os ovócitos selecionados foram distribuídos em grupos de 25 a 30 e lavados 5 vezes em meio de maturação previamente equilibrado.

Os ovócitos selecionados foram maturados em estufa a 38, 5° C, com 5% de CO_2 em ar e umidade absoluta, por 22 a 24 horas. Foi utilizado o meio 199, com L-glutamina, bicarbonato (2,2 mg/ml) e sais de Earle (Sigma, Saint Louis, EUA, M-4530), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). piruvato de sódio (22 µg/ml), 1mg/ml estradiol 17β (E_2 – Sigma, Saint Louis, EUA, E 2758), 50µg/ml hCG (Profasi hp® 5.000UI, Serono Inc., Rockland, EUA), 5µg/ml FSH (Foltropin-V®, Vetrepharm, Ontário, Canadá), e 75µg/ml gentamicina (Sigma, Saint Louis, EUA, G-1272) (Anexo C)

Após a maturação, os ovócitos foram submetidos à fecundação *in vitro* (FIV). Os espermatozóides foram selecionados pelo método do *swuim up* e a concentração ajustada para $1x10^6$ espermatozóides/ ml. A fertilização ocorreu em meio Fert-talp (Anexo A), onde os ovócitos e espermatozóides foram incubados em estufa, sob as mesmas condições, por aproximadamente 18 horas. As placas utilizadas para maturação *in vitro,* do tipo NUNC® com quatro poços, foram "lavadas" duas vezes com meio de cultura previamente estabilizado, com a intenção de armazená-las para realização da co-cultura dos embriões.

Decorridas 18 horas de FIV, os possíveis zigotos foram desnudados parcialmente (tiveram as células do *cumulus* parcialmente removidas) e transferidos paras as placas de cultivo, onde foram co-cultivados na presença de suas próprias células do *cumulus* em meio composto por HTF (Human Tubal Fluid, HTF®, Irvane) e BME (Basal Medium Eagle, BME®, Sigma), na relação 1:1 (HTF:BME) acrescido de 0,6% de BSA, 0,01% de Mioinositol e 75 μg/ml de gentamicina (Anexo C), durante sete dias, em estufa a 38, 5° C, 5% de CO_2 e umidade absoluta. Após 72h de cultivo (D3), a taxa de clivagem foi determinada e o meio foi suplementado com 10% de SFB. A taxa de produção de blastocistos foi determinada após 168h de cultivo (D7).

A porcentagem de clivagem e taxa de blastocistos foram calculadas a partir do número total inicial de ovócitos.

Para que todos os experimentos fossem concluídos, foram realizadas 20 viagens ao frigorífico, com a obtenção de 780 ovários e 4269 ovócitos, totalizando uma média de 5,5 ovócitos utilizados por ovário aspirado.

Os ovócitos selecionados foram divididos em três experimentos.

No experimento 1 avaliou-se as taxas de clivagem e formação de blastocistos após maturação ovocitária em meio suplementado com IGF-1, GH, Insulina, adicionados separadamente ou em associação.

Os ovócitos, antes da maturação, foram divididos em 5 diferentes grupos, sendo:

Grupo controle (n=532) – a maturação foi realizada em meio 199, como descrito anteriormente.

Grupo GH (n=539) – meio de maturação acrescido de GH (100 ng/ml).

Grupo IGF-1 (n=535) - meio de maturação acrescido de IGF-1 (10 ng/ml)

Grupo Insulina (n=539) – meio de maturação acrescido de Insulina (1 μg/ml).

Grupo GH, IGF-1 e Insulina em associação (n=527) **-** meio de maturação acrescido de GH (100 ng/ml), IGF-1 (10 ng/ml) e Insulina (1 μg/ml).

No experimento 2 foram avaliadas as taxas de clivagem e formação de blastocistos cultivados *in vitro* em meio suplementado com IGF-1, GH e Insulina, adicionados separadamente ou em associação.

A maturação e a fertilização foram realizadas como o descrito anteriormente (o meio de maturação foi o mesmo utilizado no grupo controle do experimento 1).

Após a fertilização, os presumíveis zigotos foram divididos em 5 grupos para o cultivo:

Grupo controle (n=323) **-** meio de cultivo sem adição de GH, IGF-1 ou GH.

Grupo GH (n=328) **-** meio de cultivo acrescido de GH (100 ng/ml).

Grupo IGF-1 (n=342) **-** meio de cultivo acrescido de IGF-1 (10 ng/ml);

Grupo Insulina (329) **-** meio de cultivo acrescido de Insulina (1 μg/ml);

Grupo GH, IGF-1 e Insulina adicionados em associação (n=314) **-** meio de cultivo acrescido de GH (100 ng/ml), IGF-1 (10 ng/ml) e insulina (1 μg/ml)

No experimento 3 a qualidade dos embriões produzidos após maturação em meio suplementado com IGF-1, GH e Insulina foi determinada pela contagem de células e pela porcentagem de células com fragmentação de DNA. Além disso, foi determinada a qualidade dos embriões produzidos em meio de cultivo suplementado com IGF-1, GH e insulina, adicionados separadamente ou em associação, determinada pela contagem de células e porcentagem de células com DNA fragmentado. Os ovócitos foram divididos em grupos como o experimento 1 e o experimento 2, totalizando 9 grupos:

Controle: maturação e cultivo realizados como nos grupos controles do experimento 1 e do experimento 2.

GH adicionado a MIV: maturação e cultivo realizados como no grupo GH do experimento 1.

IGF-1 adicionado a MIV: maturação e cultivo realizados como no grupo IGF-1 do experimento 1.

Insulina adicionada a MIV: maturação e cultivo realizados como no grupo Insulina do experimento 1.

GH, IGF-1 e Insulina adicionados a MIV: maturação e cultivo realizados como no último grupo do experimento 1.

GH adicionado ao CIV: maturação e cultivo realizados como no grupo GH do experimento 2.

IGF-1 adicionado ao CIV: maturação e cultivo realizados como no grupo IGF-1 do experimento 2.

Insulina adicionada ao CIV: maturação e cultivo realizados como no grupo Insulina do experimento 2.

GH, IGF-1 e Insulina adicionados ao CIV: maturação e cultivo realizados como no último grupo do experimento 2.

Com 96 h de cultivo (D4) uma parte das mórulas foi submetida à coloração com acridina *orange* e iodeto de propídeo, para determinação do número de células e porcentagem de células com núcleo fragmentado. Para avaliar a qualidade das mórulas produzidas no experimento 1, foram selecionadas aleatoriamente mórulas do grupo controle (n=34), GH (n=34), IGF-1 (n=30), insulina (n=22) e GH+IGF-1+insulina (n=28). Para avaliar as mórulas produzidas no experimento 2 foram selecionadas, também aleatoriamente, mórulas de todos os grupos: controle (n=34), GH (n=27), IGF-1 (n=21), insulina (n=22) e GH+IGF-1+insulina (n=26). A solução de acridina *orange* mais iodeto de propídeo foi preparada diluindo-se 100 μg de acridina *orange* (Sigma A-6014) mais 100 μg de iodeto de propídeo em 1 ml de PBS (Coligan et al., 1992). A solução foi

armazenada em tubos plásticos de 15 ml (CORNING®) protegidos da luz, sob refrigeração a 4ºC até o momento do uso.

Para a coloração do material, 10 μl dessa solução foram colocados em uma lâmina para microscopia e as mórulas foram adicionadas a essa gota. A gota foi coberta com uma lamínula com cola de silicone nos quatro cantos para fixar o material à lâmina. As lâminas foram preparadas em ambiente escuro e a leitura foi realizada em microscopia de fluorescência (filtro azul, excitação: 450 a 490nm, aumento de 400x). (Figuras 1 e 2).

Células viáveis com morfologia nuclear normal apresentaram cromatina verde brilhante com estrutura organizada, as quais, nesse trabalho, foram denominadas de **VN** (*viáveis com núcleo normal*). (Figuras 1 e 2).

Células inviáveis com coloração da cromatina laranja brilhante, devido à penetração do iodeto de propídeo, mas a estrutura nuclear organizada, bem como células com núcleo laranja altamente condensado ou fragmentado, foram denominadas **NVF** (*não viável com fragmentação de DNA)*. (Figura 1).

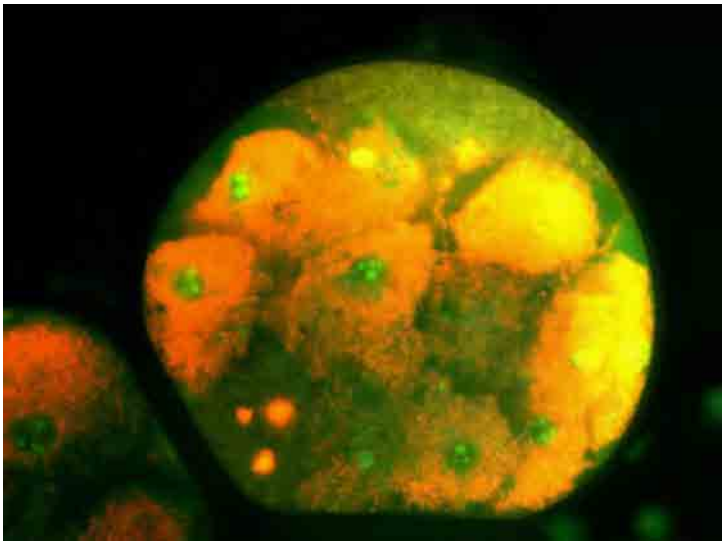

Figura 1: Células VN (núcleos corados em verde, morfologia normal) e células NVF (núcleo alaranjado, cromatina fragmentada. Aumento 400x.

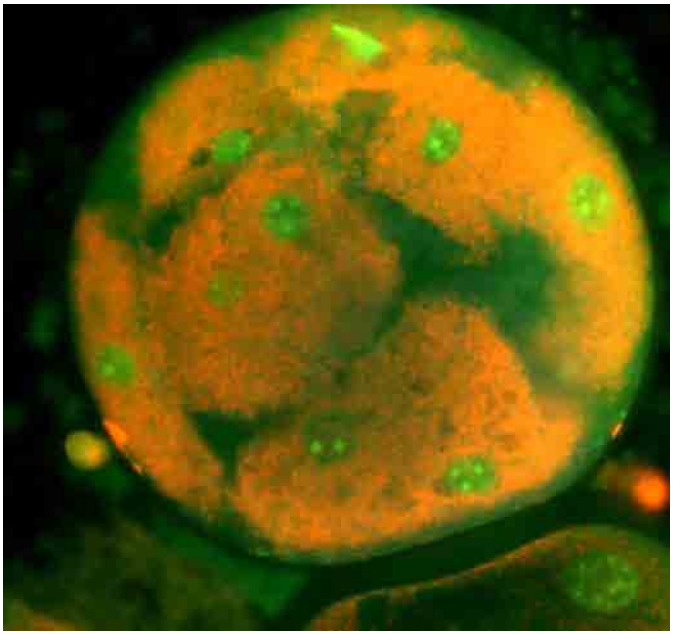

Figura 2: Células VN (núcleos corados em verde, morfologia normal). Aumento 400x.

4.2 - Análise estatística

Os valores em proporção ou porcentagem obtidos nos experimentos 1 e 2 foram analisados estatisticamente por teste qui-quadrado a 5% de probabilidade.

Para análise estatística dos valores médios de células viáveis ou com núcleo em fragmentação, por mórula (experimento 3) foi realizado o procedimento GLM (*General Linear Model*), do programa computacional SAS® (1996), obtendo-se as análises de variância e as médias estimadas, além do desvio padrão sendo essas comparadas através do teste de Tukey a 10% de probabilidade.

5- Resultados

5.1- Experimento 1 - adição de GH, IGF-1, Insulina ou todos associados ao meio de maturação oocitária.

Os resultados do experimento 1 estão expressos na Tabela 1.

A adição de IGF-1 ao meio de maturação de oócitos resultou em maior ($p<0,05$) índice de clivagem (78,88%), quando comparada aos demais, exceto para o grupo GH (77,37%), o qual apresentou resultados similares. A adição de GH também foi superior em relação a taxa de clivagem obtida nos grupo Insulina (70,62%).

No entanto, embora a adição de GH ao meio de maturação tenha levado à taxa de clivagem estatisticamente superior à taxa de clivagem obtida no grupo Insulina, estas não diferiram do observado no grupo controle (73,12%) ou no grupo onde houve a adição de GH, IGF-1 ou Insulina em associação (73,62%)

Apesar das diferenças observadas nas taxas de clivagem, não houve diferença estatística entre os grupos quando se comparou a taxa de produção de blastocistos no dia 7 de cultivo embrionário, após adição de fatores de crescimento ao meio de maturação oocitária.

Tabela 1: Proporção e percentagem de ovócitos clivados no D3 e produção de blastocistos no D 7 de cultivo embrionário, após adição de IGF-1, GH, Insulina ou todos associados ao meio de maturação oocitária.

Grupos de MIV	Clivagem (D3) (%)	Produção de Blastocistos (D7) (%)
Controle (n=532)	389/532 (73,12%)[bc]	154/532 (28,95%)[a]
IGF-1 (n=535)	422/535 (78,8%)[a]	151/535 (28,22%)[a]
GH (n=539)	417/539 (77,37%)[ab]	153/539 (28,39%)[a]
Insulina (n=539)	382/539 (70,87%)[c]	142/539 (26,35%)[a]
Todos associados (n=527)	388/527 (73,62%)[bc]	147/527 (27,89%)[a]

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste qui-quadrado ($p<0,05$)

5.2- Experimento 2 - adição de GH, IGF-1, Insulina ou todos associados ao meio de cultivo embrionário.

Os resultados estão expressos na Tabela 2.

No experimento 2, , GH, IGF-1, Insulina ou todos associados foram adicionados ao meio de cultivo embrionário. O grupo que teve adição de IGF-1 apresentou taxa de clivagem superior (87,13%) ao grupo que recebeu adição de todos associados (77,71%). Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos IGF-1, GH, Insulina ou Controle, em relação às taxas de clivagem. Da mesma forma, as taxas de clivagem dos grupos Controle, GH, Insulina ou todos os fatores foram semelhantes.

Quanto às taxas de produção de blastocistos, a adição de IGF-1, GH, Insulina ou todos os fatores não influenciou, pois não houve diferenças estatísticas entre os grupos.

Tabela 2: Proporção e percentagem de clivagem no D3 e formação de blastocistos no D7, após o cultivo embrionário em meio suplementado com IGF-1, GH, Insulina ou todos associados.

Grupos de cultivo	Clivagem (D3) (%)	Produção de Blastocistos (D7) (%)
Controle (n=323)	268/323 (82,97%)[ab]	113/323 (34,98%)[a]
IGF-1 (n=342)	298/342 (87,13%)[a]	124/342 (36,26%)[a]
GH (n=328)	275/328 (83,84%)[ab]	114/328 (34,76%)[a]
Insulina (n=329)	278/329 (84,50%)[ab]	116/329 (35,26%)[a]
Tudo (n=314)	244/314 (77,71%)[b]	97/314 (30,89%)[a]

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste qui-quadrado ($p<0,05$)

5.3-Experimento 3: Avaliação da qualidade dos embriões produzidos, indicada pelo número de células e índice de morte celular embrionária no dia 4 de cultivo.

Os resultados estão expressos na Tabela 3.

No experimento 3 avaliou-se a qualidade dos embriões produzidos após adição de IGF-1, GH, Insulina ou todos associados aos meios de maturação de ovócitos ou cultivo embrionário. Foi determinado o número de células dos embriões dos diferentes grupos testados (contagem de núcleos) e a percentagem de morte celular através da análise da fragmentação do DNA, como indicadores de qualidade embrionária (Figuras 3).

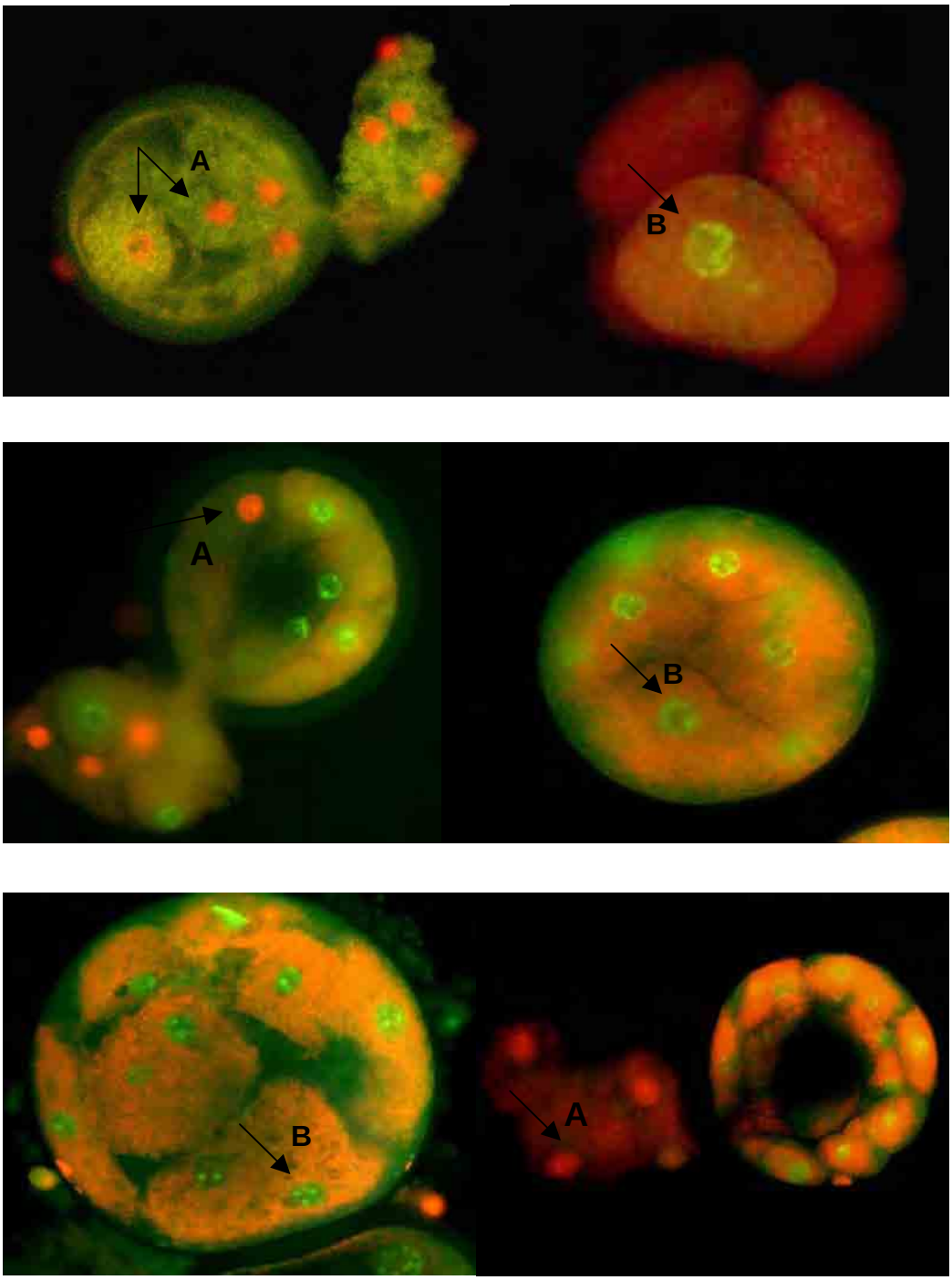

Figura 3: Embriões corados com acridina *orange* + iodeto de propídeo às 96 horas de cultivo *in vitro* (D4). Células NVF apresentam núcleos alaranjados, indicados pelas setas (A). Células VN apresentam núcleos verdes brilhantes (B). Aumento de 400x.

O número de células totais e o número de células com fragmentação de DNA determinadas quando se adicionou IGF-1, GH, Insulina ou todos componentes ao meio de maturação de oócitos (experimento 1) estão demonstrados na Tabela 3.

O número de células por embrião no dia 4 de cultivo embrionário não foi diferente estatisticamente entre os grupos do experimento 1 (controle = 10,14; IGF-1 = 10,80; GH = 9,0; Insulina = 9,36 e tudo = 10,14), mostrando que a adição de GH, IGF-1 ou Insulina ao meio de maturação oocitária não estimilou a proliferação celular dos embriões produzidos *in vitro* nessas condições.

O número médio de células viáveis com núcleo normal (VN) também não foi diferente entre os diversos grupos (9,29; 10,33; 8,5; 7,9; 8,75, respectivamente para os grupos controle, IGF-1, GH, Insulina ou todos associados); assim como não houve diferenças entre as porcentagens de células VN (controle = 89,87%; IGF-1 = 95,31%; GH = 94,75%; Insulina = 86,15% e tudo = 92%).

Em relação à taxa de fragmentação de DNA, não foram observadas diferenças entre a média ou a porcentagem de células não viáveis com núcleo fragmentado (NVF) entre os grupos controle (0,94 = 10,89%), ou maturados em presença de IGF-1 (0,27 = 2,16%), GH (0,47 = 4,66%), Insulina (1,18 = 12,14%) ou Tudo (1,5 = 12,5%). As taxas de fragmentação de DNA observadas tanto no grupo controle, quanto nos demais grupos do experimento 1 foram sempre inferiores a 15% das células totais, indicando a baixa freqüência de ocorrência de morte celular.

Tabela 3: Qualidade de embriões após 96h de cultivo embrionário (D4) produzidos após maturação de *in vitro* de ovócitos na presença de IGF-1, GH, Insulina adicionados separadamente ou em associação, indicada pelo número de células e índice de fragmentação de DNA.

Grupos de MIV (embriões avaliados)	Média e DP de células por embrião Total de células	Média e DP de células VN (%)	Média e DP de células NVF (%)
Controle (n=34)	10,14 ± 4,0 [a] (345)	9,29 ± 4,6 89,87% [a] (292/345)	0,94 ± 1,8 10,89% [a] (25/345)
IGF-1 (n=30)	10,80± 3,5 [a] (324)	10,33± 3,6 95,31% [a] (272/324)	0,27 ± 0,6 2,16% [a] (43/324)
GH (n=34)	9,00± 3,9 [a] (306)	8,5 ± 3,8 94,75% [a] (241/306)	0,47 ± 1,1 4,66% [a] (57/306)
Insulina (n=22)	9,36 ± 2,3 [a] (206)	7,9 ± 2,11 86,15% [a] (127/206)	1,18 ± 1,89 12,14% [a] (66/206)
Todos (n=28)	10,14 ± 5,38 [a] (284)	8,75 ± 3,95 92,00% [a] (217/284)	1,5 ± 2,96 12,5% [a] (38/284)
	P=0,42	**P=0,44**	**P<0,1**

Letras iguais na mesma coluna, valores não diferem estatisticamente.

VN = células viáveis com núcleo normal

NVF = células não viáveis, núcleo fragmentado.

O número de células totais e o número de células com DNA fragmentado foram determinados quando se adicionou IGF-1, GH, Insulina ou todos associados ao meio de cultivo embrionário e os resultados estão demonstrados na Tabela 4. O experimento 3 foi realizado em uma única etapa e portanto, o grupo controle utilizado para avaliar a qualidade das mórulas foi o mesmo quando adicionou-se fatores de crescimento à maturação de oócitos ou ao cultivo embrionário.

A adição de IGF-1, GH, Insulina, adicionados separadamente ou em associação ao meio de cultivo embrionário não levou a produção de embriões com maior número de células no dia 4 de cultivo, pois não houve diferença significativa desses grupos com o grupo controle, em relação ao número total de células por embrião.

A porcentagem de células viáveis com núcleo de morfologia normal (VN) não foi diferente entre os grupos Controle, IGF-I, GH, Insulina, associados separadamente ou em associação.

Porém, os resultados obtidos no grupo que recebeu Insulina ao cultivo embrionário apresentaram porcentagem de células NVF (24%) estatisticamente superior aos demais grupos: Controle (10,89%), IGF-1 (6,23%), GH (10,16%) e todos em associação (8,00%), mostrando que a adição de insulina isoladamente não foi benéfica à qualidade das mórulas obtidas, pois aumentou o número de células inviáveis com fragmentação de DNA.

Não houve diferença entre as taxas de fragmentação de DNA observadas nos grupos Controle, IGF-1, GH ou Tudo, porém o grupo que recebeu a adição de IGF-1 apresentou a menor taxa de fragmentação de DNA (6,23%), sendo este resultado oposto ao resultado obtido com a adição de Insulina, apesar desses dois fatores serem semelhantes.

Tabela 4: Qualidade de embriões após 96h de cultivo embrionário (D4) na presença de IGF-1, GH, Insulina adicionados separadamente ou em associação, indicada pelo número de células e índice de fragmentação de DNA.

Grupos de CIV (embriões avaliados)	Média e DP de células por embrião Total de células	Média e DP de células VN (%)	Média e DP de células NVF (%)
Controle (n=34)	10,14 ± 4,0 [a] (345)	9,29 ± 4,6 89,87% [a] (316/345)	0,94 ± 1,8 10,89%[a] (32/345)
IGF-1 (n=21)	9,61± 4,8[a] (202)	8,66± 4,13 91,46% [a] (182/202)	0,81 ± 1,3 6,23%[a] (17/202)
GH (n=27)	9,11± 4,6[a] (246)	7,74 ± 4,8 86,41% [a] (209/246)	1,04 ± 1,7 10,16%[a] (28/246)
Insulina (n=22)	11,00 ± 4,5[a] (242)	8,19 ± 2,88 73,34% [a] (165/242)	3,18 ± 4,5 24%[b] (70/242)
Tudo (n=26)	9,23 ± 2,9[a] 240	7,7 ± 2,65 89,40% [a] (213/240)	0,73 ± 1,5 8,00%[a] (19/240)
	P=0,505	**P<0,1**	**P<0,05**

Letras iguais na mesma coluna, valores não diferem estatisticamente.

Letras diferentes na mesma coluna representam valores diferentes estatisticamente

VN = células viáveis com núcleo normal

NVF = células não viáveis, núcleo fragmentado.

Discussão

6- Discussão.

Neste trabalho foram realizados três experimentos para estudar os efeitos da adição de GH, IGF-1 e Insulina (separadamente ou em associação) aos meios de maturação oocitária e cultivo embrionário no desenvolvimento e qualidade embrionários, avaliada pelo número de células após 96 horas de cultivo (D4) e pelo índice de fragmentação de DNA, observado na coloração com acridina *orange* associada ao iodeto de propídeo.

No experimento 1, avaliou-se a influência da adição de GH, IGF-1 e insulina ao meio de maturação de oócitos em relação às taxas de clivagem e formação de blastocistos.

A adição de IGF-1 ou GH aumentou significativamente a taxa de clivagem quando comparada ao grupo que recebeu insulina, porém não diferiram entre si. O grupo que recebeu IGF-1 também apresentou taxa de clivagem superior ao grupo controle, mas apesar da superioridade em relação ao grupo insulina, o grupo maturado na presença de GH não diferiu estatisticamente do grupo controle.

Esse aumento na taxa de clivagem do grupo maturado na presença de IGF-1 pode indicar que esse fator aumenta a taxa de fertilização dos oócitos maturados *in vitro* na sua presença. O IGF-1 melhora a maturação *in vitro* dos oócitos, tornando-os competentes para suportar o início do desenvolvimento embrionário. Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Rieger *et al.,* 1998, onde o IGF-1 associado ao EGF na maturação melhoraram as taxas de clivagem.

Esperava-se que esse mesmo efeito fosse observado quando o GH foi adicionado ao meio. Já havia sido demonstrado que *in vitro,* a adição de GH ao meio de maturação de ovócitos aumentou as taxas de clivagem (IZADYAR *et al*, 1996), pois acelerou a maturação oocitária (Moreira *et al.,* 2000). Além disso, o tratamento de vacas superovuladas com GH no momento da inseminação diminui o número de ovócitos não fertilizados na coleta de embriões, mostrando que *in vivo,* o GH também favorece a fertilização, aumentando as taxas de recuperação embrionária (Moreira *et al.,* 2000).

A adição de todos os fatores em conjunto ao meio de maturação ovocitária não beneficiou a taxa de clivagem, que neste grupo, não foi diferente do grupo controle.

Apesar das diferenças observadas em relação às taxas de clivagem, a adição de IGF-1, GH ou Insulina ao meio de maturação *in vitro* de oócitos não estimulou a produção de blastocistos, pois o índice de produção embrionária não foi diferente entre os grupos controle e aquele que recebeu GH, IGF-1 e Insulina associados.

Os resultados observados nesse trabalho diferem dos resultados observados anteriormente por Yzadyar *et al*. (1996), que obtiveram aumento no número de blastocistos produzidos, quando os ovócitos foram maturados na presença de GH, em meio livre de soro fetal bovino. Moreira *et al.* (2000, 2003) também haviam observado efeito benéfico do GH na taxa de produção embrionária, quando este fator foi adicionado ao meio de maturação de ovócitos.

Era esperado também que a adição de IGF-1 ao meio de maturação ovocitária promovesse o aumento nas taxas de embriões bovinos produzidos *in*

vitro, já que adição de IGF-1 ao meio de maturação aumentou a taxa de produção de blastocistos em outros estudos (MARKKULA e MAKAREVICH, 2001, 2002).

A utilização do soro fetal no meio de maturação de ovócitos explica por que a adição de hormônios como o GH ou a Insulina e IGF-1 não elevou as taxas de produção embrionária, pois o soro é fonte de fatores de crescimento embriotróficos (VAN LANGENDONCKT *et al*.,1997). Meios contendo soro fetal promovem a maturação de maneira eficiente, porém tornam o meio totalmente indefinido e impossibilitam estudar o requerimento de ovócitos durante a MIV. Porém, nas condições de maturação disponíveis para a realização desse estudo, é fundamental a utilização de uma fonte protéica com propriedades antioxidantes, como o SFB (RIEGER, 1992), devido à alta tensão de oxigênio presente na atmosfera de cultivo e a presença de células do *cumulus.*

O experimento 2 avaliou a influência da adição de GH, IGF-1 e Insulina ao meio de cultivo embrionário, em relação às taxas de clivagem e produção de blastocistos.

O meio de cultivo utilizado foi o HTF:BME contendo 0,6% de BSA, acrescido de 10% de SFB a partir de 96 horas de cultivo (D4). Além disso, o co-cultivo com células do *cumulus* também foi realizado para viabilizar a produção de embriões no sistema de cultivo utilizado.

A adição de IGF-1 ao meio de cultivo foi benéfica em relação à taxa de clivagem, quando comparada com o meio que recebeu todos (GH, IGF-1 e Insulina) associados, porém não foi superior às taxas de clivagem observadas nos demais grupos. O grupo que recebeu todos associados, apesar de não ter sido

significativamente inferior ao grupo controle, nem aos grupos que receberam GH ou insulina, foi o grupo que apresentou as menores taxas de clivagem e produção de blastocistos, indicando que a associação de hormônios (GH e Insulina) e fator de crescimento (IGF-1) não parece ser benéfica ao desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos. Talvez, a alteração na concentração dos hormônios utilizados, além do IGF-1, pudesse resultar em benefício ao desenvolvimento embrionário. No entanto, neste estudo não foram realizadas modificações na concentração dos hormônios utilizados e tão pouco do IGF-1. A utilização de gonadotrofinas recombinantes, livres de agentes contaminantes ou a utilização de um meio de cultivo diferente também poderiam levar a diferentes resultados, evidenciando a influência do GH, IGF-1 e Insulina ao desenvolvimento embrionário *in vitro.* Porém, essas alterações na metodologiado trabalho também não foram realizadas.

Não houve diferença estatística em relação às taxas de produção de embriões entre os diferentes grupos estudados, mas os grupos que receberam IGF-1, GH ou insulina tiveram taxas de produção embrionária consideradas elevadas para o sistema de produção utilizado nesse trabalho. O grupo controle também apresentou taxa elevada de produção de blastocistos, mas isso se deve mais uma vez ao fato de que houve adição de 10% de SFB ao meio de cultivo embrionário, a partir do dia 3 de cultivo, tornando o meio indefinido, o que pode ter mimetizado os efeitos benéficos da adição de GH, IGF-1 ou Insulina ao desenvolvimento embrionário.

Estudos anteriores apresentaram resultados diferentes a esses, pois a utilização de GH e IGF-1 no meio de cultivo aumentou significativamente a taxa de produção embrionária observada (IZADYAR *et al.*, 2000; WATSON *et al.,* 1992;

MOREIRA *et al*., 2003; MAKAREVICH e MARKKULA ,2002). Nesses estudos, os embriões foram cultivados na ausência de SFB. Nossos resultados estão de acordo com os resultados obtidos por HERNADEZ-FONSECA *et al.,* 2002, onde adição de IGF-1 ao meio de cultivo não beneficiou o desenvolvimento de embriões bovinos. Porém, esse estudo utilizou um meio quimicamente definido, sem a presença de SFB, diferentemente das condições utilizadas em nosso experimento, tornando inviável a comparação entre os resultados.

A adição de insulina ao meio de cultivo de embriões de ratos também teve efeito promotor do desenvolvimento embrionário em estudos anteriores (HERRLER *et al,* 1998; HARVEY *et al*, 1988; SHIN *et al*, 1992), diferindo de nossos resultados.

Neste estudo não houve ação benéfica da adição de hormônios como o GH e IGF-1 aos meios de maturação de ovócitos ou cultivo embrionário, porém o sistema de produção escolhido se mostrou eficiente para produzir altas taxas de embriões, tanto no experimento 1, quanto no experimento 2. Talvez, a utilização de GH, IGF-1 e Insulina seja benéfica quando o sistema de cultivo for livre de fontes protéicas como o soro fetal ou o BSA, bem como livre da presença de células em co-cultivo, pois nessas condições as taxas de produção de blastocistos são inferiores, tornando o sistema ineficiente.

No experimento 3 a qualidade dos embriões obtidos no quarto dia de cultivo foi avaliada utilizando uma solução corante composta por acridina “orange” e iodeto de propídeo. Essa coloração se mostrou eficiente para embriões bovinos em estágio inicial de desenvolvimento, possibilitando tanto a contagem do número de células, quanto a avaliação da viabilidade celular e integridade nuclear.

ZAKERI *et al.* (2002) já haviam verificado a eficiência dessa coloração na avaliação de fragmentação de DNA em embriões em estágio inicial de desenvolvimento. Não foram encontrados na literatura estudos que tivessem utilizado a acridina “orange” para avaliação dos índices de fragmentação de DNA em embriões bovinos, portanto a metodologia empregada nesse trabalho foi uma adaptação de uma coloração utilizada para verificar índice de apoptose em linfócitos de ratos (COLIGAN *et al*., 1992). Uma desvantagem dessa técnica de coloração em relação a outras técnicas, como o teste cometa ou TUNEL é que esta não permite a avaliação de embriões em estágios mais avançados de desenvolvimento, como blastocistos, pois com o desenvolvimento do embrião, os blastômeros aumentam em quantidade e diminuem em tamanho, tornando difícil a avaliação da morfologia nuclear em microscopia óptica, aonde o aumento chega a 1000 x.

A coloração de acridina “orange” não é específica para apoptose, mas como se mostrou bastante eficiente para a determinação da fragmentação de DNA e morte celular, pode-se considerar que o tipo de morte celular observado nesse trabalho foi a apoptose ou morte celular “do tipo apoptose”, já que este tipo de morte celular, segundo a literatura, é o mais comum em embriões pré-implantação (HARDY *et al.,* 1997; ZAKERI *et al*.,2002; FABIAN *et.al*., 2005).

A adição de GH, IGF-1, Insulina, separadamente ou em associação, ao meio de maturação ovocitária não estimulou a proliferação celular dos embriões produzidos nessas condições de cultivo, pois o número de células por embrião não diferiu estatisticamente entre os grupos ou entre o grupo controle. Quando essas mesmas substâncias foram adicionadas ao meio de cultivo embrionário,

também não foi observada nenhuma ação benéfica em relação à proliferação celular e conseqüentemente ao número de células por embrião.

Como o experimento foi realizado com embriões em estágios iniciais do desenvolvimento, em torno de dez células, não se pode afirmar que a adição de GH, IGf-1 ou Insulina não estimule a proliferação celular, pois geralmente, esse efeito só é observado em blastocistos, estágio que apresenta organização da massa celular interna e trofoblasto, apesar de haver receptor para GH, IGF-1 e insulina em embriões de apenas uma célula (WATSON *et al.,* 1992; IZADYAR, 2000) e de que *in vivo,* o IGF-1 está presente até em fluido folicular e secreções de tuba uterina, (SCHMIDIT *et al*., 1994), sugerindo o envolvimento desse fator nos estágios mais iniciais de desenvolvimento.

Nos estudos cujos resultados foram diferentes aos deste experimento, a adição de GH não só aumentou a taxa de produção embrionária, como promoveu o aumento no número de células dos blastocistos bovinos (MOREIRA *et al.,* 2002; MTANGO *et al*., 2003). Também já foi demonstrado que o IGF-1 pode estimular a proliferação celular da massa celular interna e conseqüentemente, aumentar o número de células de embriões de ratos (DOHERTY *et al*, 1994; HARVEY e KAYE, 1992; HERRLER *et al*., 1998). Porém, em todos esses trabalhos, o aumento da proliferação celular foi observado em blastocistos, não em embriões de apenas 4 dias de cultivo.

As taxas de fragmentação de DNA não foram diferentes entre os grupos controle ou os grupos que receberam IGF-1, GH, Insulina ou todos associados ao meio de maturação de oócitos, assim como não houve diferenças em relação às taxas de células viáveis, mostrando que a adição desses hormônios e fator de

crescimento à maturação não evitou a ocorrência de fragmentação de DNA nos embriões produzidos posteriormente.

Quando se avaliou a influência da adição de GH, IGF-1 ou Insulina ao meio de cultivo nas taxas de fragmentação de DNA, o grupo cultivado na presença de Insulina apresentou taxa de morte celular estatisticamente superior (24%) aos demais grupos, mostrando que a adição desse hormônio ao cultivo de embriões, além de não ter se mostrado benéfica em evitar a apoptose, apresentou elevada taxa de morte celular, mesmo quando comparado ao grupo controle, o qual não recebeu a adição de nenhum hormônio extra ou fator de crescimento. Os resultados obtidos com a adição de IGF-1 foram opostos aos resultados observados com a adição de Insulina, que apesar de não apresentar diferença estatística com os demais grupos (Controle, GH e todos associados), foi o grupo que apresentou a menor taxa de fragmentação de DNA (6,23%) nessas condições de cultivo.

Esperava-se que a Insulina e o IGF-1 apresentassem o mesmo efeito em relação às taxas de células em apoptose, pois são substâncias semelhantes. Talvez a ação do IGF-1, apesar de ser um fator de crescimento semelhante à insulina, seja diferente à ação da insulina, justificando a diferença entre os resultados. Além disso, a presença do BSA no meio de cultivo até o dia 4 de cultivo embrionário torna o meio quimicamente indefinido e rico em fatores de crescimento, tornando o modelo experimental inadequado, pois esses fatores também influenciaram os resultados obtidos.

Nesse estudo, os hormônios GH e Insulina e o IGF-1 não protegeram as células embrionárias contra a morte celular, tanto no experimento 1, como no

experimento 2, contradizendo a literatura referente a esse assunto. Byrne *et al* (2002) observaram que o IGF-1 preveniu a apoptose em embriões bovinos produzidos *in vitro* e esse efeito já foi observado em embriões de outras espécies, como humanos (O'NEIL 1997; SPANOS *et al*, 2000), coelhos (HERRLER *et al,* 1998), ratos (MAKAREVICH *et al*, 2002, FABIAN *et al*., 2004) e suínos (CUI *et al*, 2005).

Possivelmente, o efeito benéfico do GH, IGF-1 e Insulina na prevenção da morte celular ocorre a partir do estágio de blastocisto e por isso, já que a morte celular caracterizada pela fragmentação de DNA geralmente ocorre em estágios mais avançados de desenvolvimento, com a diminuição das taxas de mitose das células embrionárias.

De maneira geral, as taxas de fragmentação de DNA foram baixas (exceto o grupo que foi cultivado na presença de insulina) e esses resultados já eram esperados, pois estão de acordo com Frei *et al.,* (1989), que já haviam demonstrado que a apoptose é observada em embriões bovinos após o estágio de oito a 16 células, mórulas e blastocistos e Matwee *et al*., (2000) mostraram que a apoptose não é observada em zigotos (2 pró-núcleos) e embriões de duas ou três a sete células. Além disso, a percentagem de núcleos com fragmentação de DNA diminui na fase de mórula, mas aumenta novamente durante a fase de blastocisto (BYRNE *et al*., 1999).

7. Conclusão.

Nas condições experimentais apresentadas, podemos concluir:

- A adição de IGF-1, GH, adicionados separadamente ou em associação, ao meio de maturação ovocitária não estimulou a produção de blastocistos bovinos *in vitro.* . O sistema de produção utilizado mostrou-se eficiente, mesmo na ausência dos hormônios estudados (GH e Insulina) ou do IGF-1 (grupo controle), indicando que a suplentação dos meio de maturação com GH, IGF-1 e Insulina não é necessária quando o sore fetal está presente. Além disso, a adição de IGF-1, GH, Insulina ou todos associados ao meio de maturação ovocitária não estimulou a proliferação celular em mórulas após quatro dias de cultivo, bem como não foi benéfica em evitar a ocorrência de fragmentação de DNA, mostrando que não houve benefício em relação à qualidade dos embriões produzidos.

- O cultivo de embriões na presença de IGF-1, GH, Insulina adicionados separadamente ou em associação, nessas concentrações, não elevou a taxa de produção embrionária após sete dias de cultivo. O soro fetal bovino torna o sistema *in vitro* de produção embrionária eficiente, apesar de quimicamente indefinido, e parece que sua presença dispensa a adição de hormônios (GH e Insulina) ou fatores de crescimento (IGF-1) ao cultivo de embriões. A adição de GH, IGF-1 e Insulina, separadamente ou em associação, ao meio de cultivo embrionário não estimulou a proliferação celular e não evitou a ocorrência de apoptose, portanto não melhorou a qualidade dos embriões produzidos Além disso, o grupo tratado com insulina apresentou taxa de morte celular elevada, mostrando que sua adição ao meio não foi benéfica à qualidade dos embriões após quatro dias de cultivo celular.

- A coloração de acridina “orange” e iodeto de propídeo mostrou-se eficiente para avaliação do número de células e ocorrência de apoptose em embriões bovinos jovens (quarto dia de cultivo), podendo ser empregada como técnica de avaliação da qualidade embrionária nesse estágio de desenvolvimento.

8. Referências

1. APA, R; LANZONE, A.; MICELI, F; MASTRANDREA, M.; CARUSO, A.; MANCUSO, S.; CANIPARI, R. Growth hormone induces in vitro maturation of follicle and cumulus enclosed rt oocytes. **Mol. Cell Endocrinol**, v. 106, p. 207-202, 1994.

2. BAVISTER, B.D; ROSE- HELLEKANT, T.A; PYNYOPUMMINTR,T. Development of in vitro matured-in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. **Theriogenology,** v. 57, p. 127-46, 1992.

3. BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S.J.; van den HURK, R. and IZADYAR, F*.* Regulation and Modulation of Oocyte Maturation in the Bovine. **Theriogenology**, v. 47, p. 1322, 1997.

4. BYRNE, A.T; SOUTHGATE, J; BRISON, D.R; LEESE, H.J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **J. Reprod. Fértil**. v. 117, p. 97- 105, 1999.

5. CHUN, S.Y; BILLIG, H; TILLY, J.L; FURUTA, I; TSAFARI, A; HSUECH, A.J.W. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous IGF-1. **Endocrinology**, v.135, p.1845- 1853; 1994.

6. COLIGAN, J.E; KRUISBEEK, A.M; MARGULIES, D.H; SHEVACH, E.M; STROBER, W. Immunologycal assay for mouse lymphocyte . In: **Current Protocols in Immunology**. Eds. Greene Publishing and Wiley Inter Science, New York, 1992.

7. CUI, X-S; JEONG, Y-J; JUN, J-H; KIM, N-H. Insulin-like growth factor-1 alters apoptosis related genes and reduces apoptosis in porcine parthenotes developing in vitro. **Theriogenology,** v.63, p. 1070-80, 2005.

8. DALLA LIBERA, L. RAVARA, B; VOLTERRANI, M; GOBBO, V; BARBERA, M.D; ANGELINI, A; BETTO, D.D; GERMINARIO, E; VESCOVO, G. Beneficial effects of GH-IGF-1 on skeletal muscle atrophy and function in experimental heart failure. **Am J. Physiol. Cell Physiol;** v.286, p. 138-144, 2004.

9. DOHERTY, A.S; TEMELES, G.L; ACHULTZ, R.M. Temporal pattern of IGF-I expression during mouse preimplantation embryogenesis. **Mol. Reprod. Dev**, v. 37, p. 21- 26; 1994.

10. DUCIBELLA, T; DUFFY, P; REINDOLLAR, R; SU, B. Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin – stimulated meiotic maturation and aging in vivo . **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 870- 876, 1990.

11. DUCIBELLA, T; KURASAWA, S; DUFFY, P; KOPF, G; SCHULTZ, R.M.; Regulation of polyspermy block in the muse egg: Maturation dependent differences in cortical granule exocytosis and zona pellucida modifications induced by inositol 1, 4, 5- triphosphate and na activator of protein kinase C. **Biology. Reproduction**, v.48, p. 1251- 1257; 1993.

12. ECKERT, J; NIEMANN,H. In vitro maturation, fertilization and culture to to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. **Theriogenology,** v. 43, p. 1211-55, 1995.

13. FABIAN, D; IL' KOVÁ, G; REHÁK, P; CZIKKOVÁ, S; BARAN, V; KOPPEL, J. Inhibitory effect of IGF-1 on induced apoptosis in mouse preimplantation embryos cultured in vitro. **Theriogenology**, v.61, p. 745-755; 2004.

14. FABIAN, D; KOPPEL, J; MADDOX-HYTTEL,P. Apoptoic processes during mammalian preimplantation development. **Theriogenology,** v.64, p. 221-31, 2005.

15. FIRST N.L, LEIBFRIED- RUTLEDGE M; SIRARD, M. Citoplasmic control of oocyte maturation and species differences in the development of maturational competence. In: Meiotic inhibition: **Molecular Control of Meiosis**. Philadelphia, PA, Alan R Liss Inc, 1- 46, 1988.

16. FREI, R.E; SCHULTZ, G.A; CHURCH, R.B. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8- 16 cell stage of embryogenesis in the cow. **J. Reprod Fertil**, v.117, p. 97- 105; 1989.

17. FUKUI, Y.; FUKUSHIMMA, M.; TERAWAKI, Y.; ONO, H.; Effect of Gonadotrophins, Steroids and Culture Media on Bovine Oocyte Maturation in vitro. **Therigenology**, v.18, p. 161-175, 1982.

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

19. GEISERT, R.D; LEE, C.Y; SIMMEN, F.A; ZAVY, M. T; FLISS, A.E; BAZER, F.W; SIMMEN, R,C. Expression of messenger RNAs encoding insulin- like growth factor I, II, and insulin- like growth factor binding protein- 2 in bovine endometrium during the oestrous cycle and early pregnancy**. Biology of Reproduction**, v.45, p.975- 83; 1991.

20. GÓMEZ, E; DÍEZ, C. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development in vitro. **Animal Reproduction Science,** v.58, p.23-37, 2000.

21. GONG, J. G; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian follicular growth and development in heifers. **J. Reprod. Fertil**, v.97, p. 247- 254, 1993.

22. GRAHAM, M; PARTRIDGE,A; LEWIS, V; PHIPPS, W. A prospective comparison of synthetic serum substitute and human serum albumin in culture for in vitro fertilizantion- embryo transfer. **Fertil. Steril,** v. 64, p. 1036-8.

23. GROTHEY, A; VOIGT, W; SCHOBER, C; MULLER, T; DEMPKE, W; SCHMOLL, H.J. The role of insulin-like growth factor-1 and it receptor in cell growth, transformation, apoptosis and chemoresistence in solid tumors. **J. Cancer Res Clin. Onc,** v. 125, p. 166-73.

24. HAGEN, D.R., GRABOSKI, R.A. Effects of porcine pituitary growth hormone (pGH) on citoplasmtic maturation of porcine oocytes in vitro. **J. Anim. Sci**, v. 68, p. 446, 1990.

25. HARDY, K. Cell death in the mammalian blastocyst**. Mol. Hum. Reprod**, v.3, p. 919- 925; 1997.

26. HARDY, K. Apoptosis in the human embryo*.* **Rev. Reprod;** v. 4, p.125- 134; 1999.

27. HARDY, K; SPANOS, S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo**. J. Endocrinol**, v.172, p. 221-236; 2002.

28. HARVEY, M.B; KAYE, P.L. Mouse blastocysts respond matabolically to short-term stimulation by insulin and IGF-I through the insulin receptor**. Mol. Reprod. Dev**; v.29, p. 253 258; 1991.

29. HARVEY, M.B; KAYE, P.L. Insulin stimulates protein synthesis in compacted mouse embryos. **Endocrinology**, v.122, p. 1182- 1184; 1992.

30. HARVEY, M.B; KAYE, P.L. Insulin-like grwth factor-1 stimulates growth of mouse preimplantation embryos in vitro. **Mol. Reprod. Dev,** v. 31, p. 195-9, 1992-b

31. HARVEY, M.B; LECO, K.J; ARCELLANA-PANLILIO, M.Y; ZHANG, X; EDWARDS, D.R; SCHULTZ, G.A. Roles of growth factors during peri-implantation development**. Hum. Reprod.** v.10, p.712-18, 1995.

32. HERNÁNDEZ, E.R; RESNIK, C.E; SVOBODA, M.E; VAN WYK, J.J; PAYNE, D.W and ADASHI, E.Y**.** Somatomedin- C/insulin- like growth factor-1 as na anhancer of androgen byosynthesis by cultured rat ovarian cells. **Endocrinology**, v.122; p.1603-1612, 1988.

33. HERNANDEZ- FONSECA, H.J; SIRISATHIEN, S; BOSCH, P; CHO, H.S; LOTT, J.D; HAWKINS, L.L; HOLLET, R.B; COLEY, S.L; BRACKETT, B.G. Offspring resulting from direct transffer of cryopreserved bovine embryos produced in vitro in chemically defined media**. Animal Reproduction Science**, v. 69, p. 151-158; 2002.

34. HERRLER, A; LUCAS-HANN, A and NIEMANN, A. Effects of insulin-like growth factor- 1 on in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.37, p. 1213-1224; 1992

35. HERRLER, A; KRUSCHE, C.A; BEIER, H.M. Insulin and insulin- like growth factor promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1302- 1310, 1998.

36. HOLM, P; BOOTH, P.J; SCHIMIDT, M.H; GREVE, T; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum- protein. **Theriogenology,** v.52, p. 683-700; 1999.

37. HUPPERTZ,B; FRANK, H.G; KAUFMANN, P; The apoptosis cascade-morphological and immunohistochemical methods for its visualization. **Anat. Embryol. Berl,** v.200, p. 1-18, 1999.

38. IZADYAR, F; COLENBRANDER, B; BEVERS, M.M. Growth hormone stimulates in vitro bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development. **Theriogenology**, v.45, p. 279, 1996.

39. IZADYAR, F; COLENBRANDER, B; BEVERS, M.M. The stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is not mediated by IGF- I. **Proc. 13th Int Congr. Anim. Reprod,** Sydney. II: 10-7, 1996.

40. IZADYAR, F; COLENBRANDER, B; BEVERS, M.M. In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. **Mol. Reprod. And Development**, v.45, p. 372- 377, 1996.

41. IZADYAR, F; VAN TOL, H.T.A; COLENBRANDER, B; BEVERS, M.M. Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exertd through cumulus cells and not mediated by IGF- I**. Mol Reprod. Dev**., v. 47, p. 175- 180; 1997.

42. IZADYAR, F; VAN TOL, H.T.A; HAGE, W.G ; BEVERS, M.M. Pre-implantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone addition during in vitro development**. Mol. Reprod. Dev**, v.57, p. 247-255; 2000.

43. JURISCOVA, A; VARMUZA, S; CASPER, R.F. Programmed cell death and human embryo fragmentation**.** **Mol. Hum. Reprod**, v. 2, p. 93- 98; 1996.

44. JURISCOVA, A; ROGERS, I; FASCIANI, A; CASPER, R.F; VARMUZA, S. Effects of maternal age and condions of fertilization on programmed dell death during murine preimplantation embryo development**.** **Mol. Hum. Reprod**, v.4, p.139- 145; 1998.

45. KEEFER, C.L.; STICE, S.L.; DOBRINSKY, J. Effect of Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormine during bovine in vitro maturation on development following in vitro fertilization and nuclear transfer*.* **Mol. Reprod. Dev**.; v.36, p. 349-474, 1993.

46. KÖLLE, S; SINOWATZ, F; BOIE, G; LINCOLN, D. Developmental changes in the expresssion of the Growth Hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary**.** **Biology of Reproduction**, v.59, p.836- 42; 1998.

47. KÖLLE, S; STOJKOVIC, M; BOIE,G; WOLF, E; SINOWATZ, F. Growth hormone- related effects on apoptosis, mitosis and expression of conexin 43 in bovine in vitro maturation cumulus-oocyte complex. **Biol. Reprod,** v. 68, p. 1584-89., 2003.

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

49. LEE, DM; OSATHANONDH, R; YEH,J. Localization of Bcl-2 in the human fetal mellerian tract. **Fertil. Steril,** v. 70, p. 135-40, 1998.

50. LIGHTEN, A.D; MOORE, G.E; WINSTON, R.M; HARDY, K. Routine addition of human insulin- like growth factor- I ligand could benefit clinical in vitro fertilization culture***.*** **Hum. Reprod**, v.13, p.3144- 50; 1998.

51. MAKAREVICH, A.V; MARKKULA, M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin- like growth factor- I during in vitro maturation and culture***.*** **Biollogy of Reproduction**, v.66, p.386- 92; 2002.

52. MARKKULA, M; MAKAREVICH, A.V. Insulin – like growth factor- I increases the ratio of proliferating cell nuclear antigen positive cells of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.55, p.432 (abstract); 2001.

53. MATSUI, M; TAKAHASHI, Y; HISHINUMA, M; KANAGAWA, H. Insulin and insulin- like growth factor-I (IGF-I) stimulate the development of bovine embryos fertilized in vitro***.*** **J. Vet. Med Sci**, v.57, p.1109- 11; 1995.

54. MATSUI, M; TAKAHASHI, Y; HISHINUMA, M; KANAGAWA, H. Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and insulin-like growth factor- I (IGF-I) is mediated through the IGF-I receptor***.*** **Theriogenology**, v.48, p.605-16; 1997.

55. MATTIOLI, M. ***Biology*** of oocyte maturation. In: Embryonic Development and Manipulation in Animal Production. **Trends in Research and Applications** pp 17-28 Eds A Lauria and F Gandolfi. Portland Press, London; 1992.

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

57. MTANGO, N.R; VARISANGA, M.D; DONG, Y.J; RAJANAHENDRAN, R; SUZUKI, T. Growth factors and growth hormone enhance in vitro embryo

production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocysts. **Theriogenology,** v. 59, p. 1393-1402.

58. MOREIRA, F; BADINGA, L; BUMLEY, C; THATCHER, W.W. Superovulatory responses in cows receiving bovine somstotropin***.*** **J. Dairy Sci**., v.83, p. 214 (abstract); 2000.

59. MOREIRA, F; PAULA-LOPES, F.F; HANSEN, P.J; BADINGA, L; THATCHER, W.W. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 on development of in vitro derived embryos***.*** **Theriogenology**, v.57, p.895-907; 2002.

60. NEUBER, E; LUETJENS, C.M; CHAN, A.W.S; SCHATTEN, G.P. Analysis of DNA fragmentation of in vitro cultured bovine blastocysts using TUNEL. **Theriogenology**, v.57, p.2193- 2202; 2002.

61. O'NEILL, C. Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse preimplantation embryos in vitro***.*** **Biology of Reproduction**., v.56, p.229- 37; 1997.

62. O'NEIL, C. Autocrine mediators are required to act on the embryo by the 2-cell stage to promote normal development and survival of mouse preimplantation embryos in vitro. **Biol. Reprod,** v. 58, p.1303-9, 1998.

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

64. PNYOPUMMINTR,T; BAVISTER,B.D; Development of bovine embryos in cell-free culture médium: effects of type of serum, timing of its conclusion and heat inactivation. **Theriogenology,** v. 41, p. 1241-9, 1994.

65. RIEGER,D. Relationship between energy metabolism and development of early mammalian embryos. **Theriogenology,** v. 37, p. 75-93, 1992.

66. ROSENBLUM, I.Y; MATTSON, B.A; HEYNER, S. Stage specific insulin binding in preimplantation embryos***.*** **Dev. Biol**; v.116, p. 261- 263; 1986.

67. SAITO, S; NIEMANN, H. Effect of extracellular matrices and growth factors on the development of isolated porcine blastomeres***.*** **Biology of Reproduction**, v.44, p.927- 36; 1991.

68. SAS. Institute Inc., SAS-STAT. User's guide. Versão 6.11, quarta edição, v. 2, Cary. **SAS Institute Inc**, 842 p.

69. SCHIMIDT, A; EINSPANIER, R; AMSELGRUBER, W; SINOWATZ, F; SCHAMS, D. Expression of insulin- like growth factor- I (IGF-I) in the bovine oviduct during the oestrous cycle***.*** **Exp Clin Endocrinol**, v.102, p.364- 369; 1994.

70. SEGARD, H.B, MOULIN, S; BOUMARD, S; AUGIER DE CRÉMIERS, C; KELLY, P.A; FINIDORI. Autocrine growth hormone production apoptosis abd inhibits differentiation in C2C12 my-oblasts. **Cell. Signal,** v.15, p. 615-23, 2003.

71. SHIN, K.D; RHA, J.G. Effect of insulin on cleavage and protein synthesis in mouse preimplantation mouse embryos***.*** **J. Cathol Med Coll**, v. 45, p.597- 607; 1992.

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

73. SIROTKIN, A.V, MAKAREVICH, A.V. GH regulates secretory activity and apoptosis in cultured bovine granulose cells through the activation of the cAMP-protein kinase A system. **J. Endocrinol,** v. 163, p. 317-27.

74. SMITH, R.M; GARSIDE, W.T; AGHAYAN, M; SHI, C.Z; SHAH, N; JARRET, L. Mouse preimplantation embryos exhibit receptor-mediated binding and transcytosis of maternal insuli-like growth factor-1. **Biol. Reprod.** v.49, p. 1-12, 1993.

75. SIRISATHIEN, S; HERNANDEZ-FONSECA, H.J; BRACKETT, B.G. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-1 on bovine blastocyst development in vitro***.*** **Animal Reproduction Science**, v.77, p.21-32; 2003.

76. SOOM, A.V; VANROOSE, G; LAEVENS, H; KRUIF, A.D. Apoptosis in in vitro produced bovine embryos. **Therigenology**, v.53, p.367, 2000.

77. SPANOS, S; BECKER,D.L; WINSTON, R.M; HARDY, K. Anti- apoptotic action of insulin- like growth factor- I during human preimplantation embryo development. **Biol. Reprod**, v. 63, p.1413- 20; 2000.

78. SPICER, L.J; ECHTERNKAMP, S.E. The ovariam insulin and insulin- like growth factor system with na emphasis on domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.12, p.223-45, 1995.

79. TSAFRIRI, A. The Control of Meiotic Maturation in Mammals*.* In: Biology of Fertilization, vol. 1. **Model Systems and oogenesis** pp 221-252 Eds CB Metz and Monroy. Academic Press Inc, Orlando; 1985.

80. THOMPSON, JG; SHERMAN, ANM, ALLEN, N.W; MC GOWAN, L.T; TERVIT, H.R. Total protein contents and protein synthesis within pre-elogation bovine embryos. **Mol. Reprod. Dev,** v.50, p. 139-45, 1998.

81. USUI, N; YANAGIMACHI, R; Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at varius stages of maturation, fertilization and early development. **J. Ultrastruct Res**, v.57, p. 289- 308, 1976.

82. VAN DER WESTERLAKEN, L.A.J.; VAN DER SCHANS, A.; EYESTONE, W. H.; DE BOER, H.A. Kinertics of first polar body extrusion and the effect of time of stripping of the cumulus and time of insemination on developmental competence of bovine oocytes***.*** **Theriogenology**, v.42, p.361- 70.

83. VAN LANGENDONCKT, A; DONNAY,I; SCHUURBIERS, N; AUQUIER, P; CAROLAN, C; MASSIP, A. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. **J. Reprod Fertil,** v. 109, p. 87-93, 1997.

84. VAN SOON, A; VAN VLAENDEREN, I; MAHMOUDZADEH, A.R; DELUYKER, H; DE KRUIF, A. Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. **Theriogenology,** v. 38, p. 905-19, 1992.

85. VELDHUIS, J.D; RODGERS, R.J and FURLANETTO, R.W***.*** Synergistic actions of estradiol and the insulin- like growth factorsomatomedin- C on swine ovarian (granulosa) cells. **Endocrinology**, v.119, p.530-38, 1986

86. WATSON, A.J; HOGAN, A; HAHNEL, A; WIEMER, K.E; SCHULTZ, G.A. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo***.*** Mol. Reprod Dev; v.31, p. 87- 95; 1992.

87. WATSON, A.J; WESTHUSIN, M.E; WINGER, Q.A. IGF paracrine and autocrine interactinos between conceptus and oviduct***.*** **J. Reprod. Fertil Suppl**; v.54, 303- 315; 1999.

88. WEBB, R; GONG, J.G; BRAMLEY, T.A. Role of growth hormone and intrafollicular peptides in follicle development in cattle . **Theriogenology**, v.1, p. 25-30, 1994.

89. XIA, P; TEKPETEY, F.R; ARMSTRONG, D.T. Effect of IGF- I on pig oocyte maturation, fertilization and early embryonic develoopment in vitro, and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity**. Mol. Reprod. Dev**, v.38, p. 373- 379; 1994.

90. YOUNIS, A. I.; BRACKETT, B. G.; FAYRER-HOSKEN, R. A. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro*.* **Gamet Res**earch, v. 23, p.189- 201, 1989.

91. ZAKERI, Z; LOCKSHIN,R. Cel death during development. **J. Immunological Methods,** v. 265, p. 3-20, 2002.

92. ZUELKE, K.A.; BRACKETT, B.G. Luteinizing hormone enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. **Biology of Reproduction,** v. 43, p. 784- 87, 1990.

Anexos

Anexo - A

Meios estoque, armazenados refrigerados.

Meios	Referências	Utilização
Meio 199 (Médium 199)	Sigma –Aldrich (M-4530)	Maturação
Meio Fert TALP	Produção própria	Fertilização
Meio HTF (Human Tubal Fluid, HTF®)	Irvane	Cultivo
BME (Basal Medium Eagle, BME®)	Sigma –Aldrich	Cultivo

Fert- TALP Stock

Componente	Referência	Concentração (mM)
NaCl (S 5886)	Sigma- S5886	114,00
KCl (P 4504)	Sigma- P4504	3,20
$NaHCO_3$ (S 5761)	Sigma- S5761	25,00
$NaH_2PO_4H_2O$ (S 5136)	Sigma- S 5136	0,34
L- Na Lactato (L 7900)	Sigma- L7900	10,00
Fenol (P 0290)	Sigma- P0290	1ul/ml
$CaCl_2$ $2H_2O$ (C 7902)	Sigma- C7902	2,00
$MgCl_2$ $6H_2O$ (M2670)	Sigma- M2670	0,50

pH 7,4
Osmolaridade 280-300mOSM
Filtrar
Validade 2 semanas

Anexo-B

Soluções estoque, mantidas congeladas.

FSH

Hormônio FSH	50 unit
M-199 Earles salt	25 ml

Alíquota de 60 µl, manter congelado

LH

Hormônio LH	50 unit
M-199 Earles salt	25 ml

Alíquota de 60µl, manter congelado

Estradiol

Estradiol	0,004g
Etanol 95%	4 ml

Alíquota de 20µl, manter congelado

Piruvato de sódio (25mM)

Na pruvato (Sigma P5280)	0,0220g
Meio 199	10 ml

Filtrar
Alíquota de 180ul

PHE (Penicilamina, Hipotaurina e Epinefrina)

SOLUÇÃO ESTOQUE HIPOTAURINA (1mM)

Hypotaurina (sigma H-1384)	0,00109g (~0,0011g)
Solução Salina	10,00 ml

SOLUÇÃO ESTOQUE PENICILAMINA (2mM)

Penicilamina (sigma P-4875)	0,0030 g
Solução Salina	10,00 ml

SOLUÇÃO DILUIÇÃO DA EPINEFRINA

Na lactato	165 ul
Metabisulfeto de sódio	0,0500g
Água ultra pura (Milli- Q)	50 ml (q.s.)

pH 4,0
Filtrar

SOLUÇÃO EPINEFRINA (ESCURO)

Epinefrina (sigma – E-1635)	0,0183g
Solução Diluição de Epinefrina	40 ml (q.s.)

SOLUÇÃO FINAL DE PHE (ESCURO)

Solução Estoque Penicilamina	10 ml
Solução Estoque Hypotaurina	10 ml
Solução Epinefrina	8 ml
Solução Salina	16 ml

Alíquota 0,5 ml
Envolver ependorfes com papel alumínio
Estocar em freezer -80ºC ou não frost-free, por 2 semanas

SOLUÇÃO DE HEPARINA (10 ug/ ml para FIV)

Heparina (Sigma H-3125	0,01 g
Meio FIV	10,0 ml

Alíquota de 180 ul

Anexo C

Soluções de trabalho

Maturação	Volume final 10 ml
Meio TCM 199 estoque	9 ml
Soro Fetal Bovino	1 ml
FSH estoque	50 µl
LH estoque	50 µl
Piruvato estoque	100 µl
Filtrar	
Estradiol estoque	8 µl
Gentamicina	50 µl

Estabilizar na incubadora 2 horas antes de utilizar.

Meio FIV estoque (swin up)	Volume final 10 ml
Meio Fert- TALP	10 ml
BSA	0,06 g
Cafeína	0,005 g
Piruvato estoque	100 µl
Filtrar	
Gentamicina	50 µl
Meio FIV para fertilização	
Meio FIV estoque	10 ml
PHE	440 µl
Heparina	110 µl

Estabilizar na incubadora 2 horas antes de utilizar.

Meio Cultivo	Volume final 10 ml
Meio HTF estoque	5 ml
Meio BME estoque	5 ml
BSA	0,06 g
Piruvato estoque	100 µl
Mionositol	0,006 g
Filtrar	
Gentamicina	50 µl

Estabilizar na incubadora 2 horas antes de utilizar.