

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**INFLUÊNCIA DO FLUIDO FOLICULAR E DA PROTEÍNA
RECOMBINANTE HUMANA GDF9 NO MEIO DE
MATURAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DE EMBRIÕES
BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

Maria Helena Coelho Cruz

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Março de 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

INFLUÊNCIA DO FLUIDO FOLICULAR E DA PROTEÍNA
RECOMBINANTE HUMANA GDF9 NO MEIO DE
MATURAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DE EMBRIÕES
BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Maria Helena Coelho Cruz

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia

Co-Orientadora: Dra. Naiara Zoccal Saraiva

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Março de 2012

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: INFLUÊNCIA DO FLUIDO FOLICULAR E DA PROTEÍNA RECOMBINANTE HUMANA GDF9 NO MEIO DE MATURAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *in vitro*

AUTORA: MARIA HELENA COELHO CRUZ

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. NAIARA ZOCCAL SARAIVA

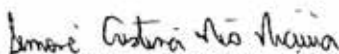
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. NAIARA ZOCCAL SARAIVA
Pós-Doutoranda / Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal /
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. CESAR ROBERTO ESPER
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. SIMONE CRISTINA MÉO NICIURA
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / São Carlos

Data da realização: 30 de março de 2012.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIA HELENA COELHO CRUZ – nascida no município de Vitória da Conquista, Bahia, aos 22 dias do mês de maio de 1986, concluiu o ensino médio no “Educandário Juvêncio Terra”, na cidade de Vitória da Conquista, BA, em dezembro de 2003. Ingressou em março de 2005 no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Santa Cruz, UESC, no município de Ilhéus, BA, foi monitora da disciplina Fisiopatologia da Reprodução de março a dezembro de 2009, fez iniciação científica voluntária com o projeto intitulado: “Avaliação de carcaças de ovinos dorper x santa inês alimentados em confinamento com diferentes dietas, no semi-árido baiano” de janeiro a setembro de 2009. Concluiu, em fevereiro de 2010, o curso superior em Medicina Veterinária. Publicou um artigo de sua autoria intitulado: “Eficácia de implantes reutilizados de norgestomet no controle do ciclo estral de cabras leiteiras” na Revista Brasileira de Medicina Veterinária em 2010, e foi co-autora de outros dois: “Puberdade em Marrãs Saanen, Anglonubiana e meio sangue Saanen x Anglonubiana criadas em região tropical” na Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal em 2009 e “Puberty and sexual maturity in Anglonubian male goats raised under semi-intensive system” na Revista Brasileira de Zootecnia em 2011. Ingressou, em março de 2010, no programa de Pós-Graduação, ao nível de mestrado, sob orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na FCAV – UNESP de Jaboticabal, com bolsa de mestrado da CAPES.

“Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo, à
sombra do Onipotente descansará...”
(Salmo 91)

Dedico a Deus.

E à minha família, meus amores, meu
porto seguro: Jurandir, Cláudia e
Luisa.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me permitido mais essa vitória.

À minha família Jurandir, Cláudia e Luísa por todo amor, carinho, compreensão, orientação, paciência...

Aos meus amados avós: vovô Aldo (*in memoriam*), vovô Bio, vovó Senhora, vovó Lu pelo amor, atenção e carinho.

A todos os meus tios, tias em especial às minhas tias Giedra e Branca e a todos os meus primos e primas em especial: Dinha, Jack, Leti, Ninho.

À minha bisa vovó Dulce e aos meus tios, tias, primos e primas de São Paulo e Campinas, em especial às minhas tias Marta e Silvana, tio Toninho e Sandoval, e aos primos Dulcemara e Phelipe, que me acolheram e apoiaram com todo carinho, nesses dois anos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, pelos ensinamentos.

À minha co-orientadora Dra. Naiara Zoccal Saraiva, por estar sempre ao meu lado como mestre e grande amiga, nunca terei palavras suficientes para expressar minha gratidão.

Aos meus colegas e amigos Clara Slade, Maite del Collado e Milton Rezende, pelos ensinamentos, paciência e amizade, desde a elaboração do projeto, execução dos experimentos, análises estatísticas e redação final.

Aos colegas de laboratório Ana Paula Perini, Bianca Faccio, Bruna Mazetti, Carla D'Amatto, Dan Arnold, Danilas Salinet, Felipe Barros, Flávia Lopes, Guilherme Fazan, Letícia Zoccolaro, Luciana Padilha, Marcela Soriani, Maria Emília Oliveira, Paula Savi e Tatiane Tezner pela companhia, atenção e amizade.

Aos funcionários do laboratório Edson Aguiar, Ivo Almeida, Isabel Natarelli e Roberta Vantini, sempre presentes e prestativos.

Aos meus amigos de Jaboticabal, em especial Adriana Castro, Uliana Pimentel, Diego Viana, Roberta Renzo, e pessoal das repúblicas RepHour, As Coyotes e Caipirada, pela amizade, carinho e muitos bons momentos.

À todos os estagiários que me ajudaram durante os experimentos.

Muito Obrigado!!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	03
2.2 Maturação oocitária <i>in vivo e in vitro</i>	05
2.3 A Superfamília TGF- β	10
2.3.1 Fator de Diferenciação de Crescimento 9.....	11
2.4 Fluido Folicular.....	14
2.5 Fertilização <i>in vitro</i>	16
2.6 Cultivo <i>in vitro</i> de embriões.....	17
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo geral.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Local e período do estudo.....	20
4.2 Obtenção dos ovários.....	20
4.3 Obtenção e estocagem do Fluido Folicular (FF).....	20
4.4 Obtenção e seleção dos complexos de células do <i>cumulus</i> e oócitos.....	21
4.5 Maturação de oócitos.....	21
4.6 Avaliação da maturação oocitária.....	21

4.7	Processamento do sêmen.....	23
4.8	Fertilização <i>in vitro</i>	23
4.9	Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões.....	24
4.10	Determinação das taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário.....	24
4.11	Avaliação da qualidade embrionária.....	24
4.12	Delineamento experimental.....	25
4.12.1	Experimento 1. Efeito da adição de Fluido Folicular (FF) no meio TCM199 sobre o percentual de oócitos bovinos maduros em diferentes períodos (22 a 28 h) de maturação <i>in vitro</i>	25
4.13.1	Experimento 2. Efeitos de diferentes momentos de fecundação (24 e 26h) após MIV na presença de Fluido Folicular (FF) sobre a taxa de clivagem e o desenvolvimento de embriões bovinos.....	25
4.14.1	Experimento 3. Efeito da adição da proteína recombinante humana GDF9 em associação ao fluido folicular nos meios de maturação sobre as taxas de clivagem, desenvolvimento e qualidade de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i>	26
4.6	Análise estatística.....	26
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1	Experimento 1.....	27
5.2	Experimento 2.....	32
5.3	Experimento 3.....	40
6.	CONCLUSÕES	45
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
	ANEXO	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
BI	Blastocisto
BIs	Blastocistos
BSA	Albumina sérica bovina
°C	Grau Celsius
Céls	Células
CIV	Cultivo embrionário <i>in vitro</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
COC	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
CP	Corpúsculo polar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
FF	Fluido folicular
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GC	Grânulos corticais
GDF9	Fator de diferenciação de crescimento 9
GVBD	Ruptura da vesícula germinativa
H	Horas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
LH	Hormônio luteinizante
MCI	Massa celular interna
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MG	Miligramas
Min	Minutos
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
Nm	Nanômetro
N ₂	Nitrogênio
O ₂	Oxigênio
PBS	Tampão salina fosfato
PHE	Penicilamina, hipotaurina e epinefrina
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PN	Pronúcleo
PVA	Álcool polivinílico
PVP	Polivinil pirrolidona
SAS	“Statistical analysis system”

SB	Solução de bloqueio
SFB	Soro fetal bovino
SOF	Fluido sintético de oviduto
T	Número total de células
TALP	“Tyrode’s Albumin Lactate and Pyruvate”
TCM-199	“Tissue culture medium 199”
TF	Trofoblasto
VG	Vesícula germinativa
ZP	Zona pelúcida
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
%	Porcentagem
χ ²	Qui-quadrado

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema da distribuição das organelas citoplasmáticas durante a maturação, fertilização e formação do zigoto bovino.....	06
Figura 2.	Membros da superfamília TGF- β envolvidos na comunicação bi-direcional entre as células da teca e granulosa e entre as células da granulosa e os oócitos.....	10
Figura 3.	Aspecto morfológico da progressão nuclear em oócitos bovinos MIV por 24h, corados com Hoechst 33342 e avaliados sob microscopia de epifluorescência.....	28
Figura 4.	Aspecto morfológico da distribuição dos grânulos corticais (GC) em oócitos bovinos MIV por 24h, corados com lecitina (específica α -D-manose) conjugada a FITC, e avaliados sob microscopia de epifluorescência.....	31
Figura 5.	Taxa de maturação nuclear (TN) e citoplasmática (TC) de oócitos bovinos 22, 24, 26 e 28 horas após maturação <i>in vitro</i> em meio TCM199 (T0) e TCM199 suplementado com 25% (T25), 50% (T50), 75% (T75) e 100% (T100) de fluido folicular.....	32
Figura 6.	Taxa de clivagem, taxa de blastocistos e taxa efetiva de blastocistos bovinos fecundados 24, 26 e 28 horas após maturação <i>in vitro</i> em meio TCM199 (T0) e TCM199 suplementado com 25% (T25), 50% (T50), 75% (T75) e 100% (T100) de fluido folicular.....	36
Figura 7.	Fotomicrografias de blastocistos (sete dias após a FIV) avaliados pela técnica de coloração diferencial sob microscopia de epifluorescência. Núcleo das células da massa celular interna (azul, Hoechst 33342) e núcleo das células do trofoblasto (rosa, iodeto de propídeo + Hoechst).....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Taxa de maturação nuclear (TMN) de oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i> em diferentes horários, em meio TCM199 (T0) e TCM199 suplementado com 25% (T25), 50% (T50), 75% (T75) e 100% (T100) de fluido folicular.....	28
Tabela 2.	Taxa de maturação citoplasmática (TMC) de oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i> em diferentes horários, em meio TCM199 (T0) e TCM199 suplementado com 25% (T25), 50% (T50), 75% (T75) e 100% (T100) de fluido folicular.....	30
Tabela 3.	Taxa de clivagem de embriões bovinos fecundados 24, 26 e 28 horas após maturação <i>in vitro</i> em meio TCM199 (T0) e TCM199 suplementado com 25% (T25), 50% (T50), 75% (T75) e 100% (T100) de fluido folicular.....	32
Tabela 4.	Taxa de blastocistos bovinos fecundados 24, 26 e 28 horas após maturação <i>in vitro</i> em meio TCM199 (T0) e TCM199 suplementado com 25% (T25), 50% (T50), 75% (T75) e 100% (T100) de fluido folicular.....	34
Tabela 5.	Número de células da MCI, TF e número de células totais em embriões bovinos fecundados 24 ou 26 horas após maturação e cultivados <i>in vitro</i> por sete dias em meio TCM199 (T0) e TCM199 acrescido de 25% (T25), 50% (T50) de fluido folicular.....	37
Tabela 6.	Percentual de embriões bovinos superiores fecundados 24 ou 26 horas após maturação e cultivados <i>in vitro</i> por sete dias em meio TCM199 (T0) e TCM199 acrescido de 25% (T25) ou 50% (T50) de fluido folicular.....	38
Tabela 7.	Frequência (%) média de embriões superiores (MCI>34; TF>73; T>107) produzidos com oócitos fecundados 24 ou 26 horas após maturação e cultivados <i>in vitro</i> por sete dias em meio TCM199 (T0) e TCM199 acrescido de 25% (T25) ou 50% (T50) de fluido folicular.....	38
Tabela 8.	Taxa de clivagem (TC) e taxa de blastocistos (TB) bovinos fecundados 24 horas após maturação <i>in vitro</i> em meio TCM199 (T0) e TCM199 suplementado com 25 ng/mL (T25), 100 ng/mL (T100) e 200 ng/mL (T200) da proteína recombinante humana GDF9, com ou sem 25% de fluido folicular.....	40

Tabela 9.	Número de células da MCI, TF e totais em embriões bovinos fecundados 24 horas após maturação <i>in vitro</i> em meio TCM199 (T0) e TCM199 suplementado com 25 ng/mL (T25), 100 ng/mL (T100) e 200 ng/mL (T200) da proteína recombinante humana GDF9, com ou sem 25% de fluido folicular.....	42
Tabela 10.	Percentual de embriões bovinos superiores fecundados 24 horas após maturação <i>in vitro</i> em meio TCM199 (T0) e TCM199 suplementado com 25 ng/mL (T25), 100 ng/mL (T100) e 200 ng/mL (T200) da proteína recombinante humana GDF9, com ou sem 25% de fluido folicular.....	43
Tabela 11.	Frequência (%) média de embriões superiores (MCI>31; TF>64; T>96) produzidos com oócitos fecundados 24 horas após maturação <i>in vitro</i> em meio TCM199 (T0) e TCM199 suplementado com 25 ng/mL (T25), 100 ng/mL (T100) e 200 ng/mL (T200) da proteína recombinante humana GDF9, com ou sem 25% de fluido folicular.....	44

INFLUÊNCIA DO FLUIDO FOLICULAR E DA PROTEÍNA RECOMBINANTE HUMANA GDF9 NO MEIO DE MATURAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

RESUMO – Este estudo objetivou avaliar a influência do fluido folicular (FF) e da proteína recombinante humana GDF9 adicionados ao meio de maturação sobre a qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Foram realizados três experimentos utilizando o meio TCM199 como meio básico de maturação. No primeiro experimento, os oócitos foram maturados em cinco diferentes meios (0%, 25%, 50%, 75% ou 100% de FF) em quatro tempos de maturação (22, 24, 26 ou 28 h). No segundo experimento, os oócitos foram maturados nos mesmos meios utilizados no primeiro experimento e fecundados em três diferentes tempos (24, 26 ou 28 h). No terceiro experimento, foram utilizados dois meios: controle (sem FF) ou com 25% de FF e quatro níveis de suplementação (0, 25, 100 ou 200 ng/mL) com GDF9. O FF promoveu retardo da progressão meiótica, afetando a maturação nuclear e a migração de grânulos corticais para a periferia dos oócitos. O FF em altas concentrações influenciou negativamente as taxas de clivagem e de blastocisto. O GDF9, com (25%) ou sem FF, não influenciou as taxas de clivagem e de blastocisto, no entanto, interferiu positivamente sobre o percentual de embriões considerados superiores. O percentual mais elevado (82,22%) de embriões classificados como superiores foi obtido com o uso de 200 ng de GDF9 em meio de maturação acrescido de 25% de FF. Em conclusão, a adição do fluido folicular (75% e 100%) ao meio de maturação *in vitro* retarda a progressão meiótica, sincronizando a maturação nuclear com a citoplasmática e a suplementação do meio de maturação com proteína recombinante humana GDF9 melhora a qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*, baseando-se na avaliação da proporção do número de células da massa celular interna (MCI) em relação ao número total de células.

Palavras-chave: bovinos, oócitos, fluido folicular, fator de crescimento, maturação *in vitro*.

INFLUENCE OF FOLLICULAR FLUID AND RECOMBINANT HUMAN GDF9 ADDED TO THE MATURATION MEDIA ON THE QUALITY OF *IN VITRO* PRODUCED BOVINE EMBRYOS

SUMMARY - This study aimed to evaluate the effects of follicular fluid (FF) and recombinant human GDF9 added to the maturation media on the quality of *in vitro* produced bovine embryos. Three experiments using TCM199 medium as basic maturation media were performed. In the first experiment oocytes were matured in five different media (0%, 25%, 50%, 75% or 100% of FF) during four maturation times (22, 24, 26 or 28 h). In the second experiment, the oocytes were matured in the same five media used in the first experiment and fertilized at three different times (24, 26 or 28 h). In the third experiment were used two media: control (without FF) or with 25% FF combined with four levels of supplementation (0, 25, 100 or 200ng/mL) with GDF9. The FF promoted delay of the meiotic progression, affecting nuclear maturation and cortical granules migration to the oocyte periphery. In addition FF influenced the cleavage and blastocyst rates. GDF9, without or added to FF did not affect the cleavage and blastocyst rates, however, a positive influence on the percentage of embryos considered superior was observed. The highest percentage (82.22%) of embryos considered superior was obtained with maturation media added with 25% of FF and supplemented with 200 ng of GDF9. In conclusion, addition follicular fluid (75% and 100%) to the *in vitro* maturation media delays meiotic progression, synchronizing nuclear to cytoplasmic maturation, and supplementation of maturation media with recombinant human GDF9 improves the quality of bovine embryos *in vitro* produced, based on inner cell mass cells (ICM) proportion, relative to the total cell number

Keywords: bovine, oocyte, follicular fluid, growth factor, *in vitro* maturation.

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma ferramenta auxiliar e estratégica no processo reprodutivo dos animais, uma vez que pode acelerar a produção de animais geneticamente superiores e dar suporte para o avanço do conhecimento em áreas correlatas de pesquisas quanto ao desenvolvimento embrionário pré implantacional.

A PIVE pode ser dividida em quatro etapas básicas: a recuperação de oócitos de folículos antrais; a maturação dos oócitos *in vitro*; a fecundação *in vitro* e o cultivo embrionário *in vitro*. Estudos demonstram que a maturação dos oócitos é uma das etapas mais importante na PIVE, pois o oócito dará suporte ao desenvolvimento embrionário inicial (MOHAN *et al.*, 2002).

No processo de maturação oocitária ocorrem complexas cascatas de ativação e inibição de enzimas, hormônios e fatores de crescimento, resultando na maturação nuclear e citoplasmática (CASTRO E PAULA e HANSEN, 2007). A maturação nuclear ocorre de forma espontânea, sendo que a remoção mecânica do oócito de dentro do folículo é capaz de desencadear o processo, enquanto que a maturação citoplasmática acontece de forma mais lenta e gradativa (GORDON, 1994). Sob condições *in vitro*, essas duas etapas da maturação tendem a ocorrer em momentos diferentes, resultando em uma baixa viabilidade oocitária e baixa taxa de fertilização (SIRARD *et al.*, 1995; BEVERS *et al.*, 1997).

Desta forma, a identificação de substâncias capazes de retardar o momento da maturação nuclear e assim permitir que as modificações citoplasmáticas e nucleares ocorram de forma mais sincrônica é objetivo de numerosos estudos. O fluido folicular, composto por eletrólitos, hormônios, aminoácidos e fatores de crescimento, participa ativamente do processo de maturação nuclear e citoplasmática (AGUILAR *et al.*, 2001).

Ainda, durante o processo de maturação *in vitro*, o fator de crescimento GDF9 (*growth differentiation factor -9*), pertencente à superfamília TGF- β , é sintetizado fisiologicamente pelas células foliculares da teca, granulosa e oócito. Tal fator atua de forma autócrina e parácrina, modulando o crescimento e o desenvolvimento folicular

(KAYANI *et al.*, 2009). Embora seu modo de ação ainda não tenha sido totalmente estabelecido, observações *in vitro* indicam que o GDF9 tem a capacidade de promover a expressão de genes ligados ao processo de maturação e induzir mitoses nas células da granulosa e da teca (VITT *et al.*, 2000), estimulando o crescimento dos folículos ovarianos e a proliferação das células do *cumulus in vitro*, o que favorece o desenvolvimento embrionário (HUSSEIN *et al.*, 2006).

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da utilização do fluido folicular e da proteína recombinante humana GDF9 no meio de maturação sobre a qualidade dos embriões obtidos, a fim de se otimizar o processo de produção *in vitro* de embriões bovinos.

Como hipótese, parte-se do princípio de que a adição de fluido folicular no meio de maturação TCM199 resulta em sincronia da maturação nuclear e citoplasmática e, adicionalmente, a suplementação do meio com a proteína recombinante humana GDF9 pode melhorar a sincronia da maturação e, conseqüentemente, promover melhoria da qualidade embrionária após a fecundação *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma importante biotécnica de reprodução assistida quando aplicada a mamíferos domésticos de interesse econômico. Além disso, é uma metodologia de rotina para pesquisas na área de transgenia, clonagem, sexagem de embriões, bem como é um procedimento comercial que auxilia nos programas de teste de progênie e melhoramento genético (PERINI, 2007).

A técnica da PIVE compreende algumas etapas que vão desde a recuperação dos oócitos até o cultivo embrionário *in vitro*. Há mais de uma década, a técnica de aspiração folicular transvaginal tem sido a melhor opção para a recuperação de oócitos *in vivo* na espécie bovina (GONÇALVES *et al.*, 2008).

Essa biotécnica pode ser utilizada como uma ferramenta para pesquisa dos fenômenos biológicos que ocorrem durante a maturação, a fecundação e o cultivo *in vitro* de oócitos, a capacitação espermática e os eventos relacionados ao início do desenvolvimento embrionário na fase de pré-implantação (COELHO, *et al.*, 2000). Além disso, tem sido utilizada para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir o descarte precoce de fêmeas portadoras de alterações adquiridas que as impeçam de reproduzir pela forma natural ou via transferência de embriões (GONÇALVES *et al.* 2007).

Entretanto, há diferenças evidentes quanto à capacidade de desenvolvimento embrionário entre oócitos maturados *in vitro* e aqueles maturados *in vivo* (CHOI *et al.*, 1998). Estudos demonstram que sob condições *in vitro*, os processos de maturação nuclear e citoplasmática ocorrem em diferentes momentos (SIRARD *et al.*, 1995; BEVERS *et al.*, 1997), o que resulta em uma taxa de blastocistos em torno de 35% (RIZOS *et al.*, 2002), com qualidade embrionária inferior aos embriões produzidos *in vivo* (GONÇALVES *et al.*, 2008) e conseqüentemente em baixa taxa de prenhez (PETERSON *et al.*, 2003).

Além disso, são descritas diversas alterações em fetos e bezerros originados de embriões produzidos *in vitro*, em maior frequência que *in vivo*, tais como: abortos, distocias, peso elevado ao nascimento (síndrome do bezerro grande), alta taxa de mortalidade neonatal (FARIN *et al.*, 2001) e até mesmo lesões cerebrais (RICHARD e SIRARD, 1996).

A fertilização oocitária e o desenvolvimento do embrião são de grande complexidade, e necessitam de fatores específicos e expressão gênica bem orquestrada. Esses eventos, coletivamente chamados de embriogênese pré-implantacional, são iniciados por meio da síntese de proteínas durante a oogênese até o alcance do estágio de ativação do genoma embrionário (MOHAN *et al.*, 2002)

Embora durante o desenvolvimento embrionário ocorram as principais modificações epigenéticas no embrião, as quais podem afetar a expressão gênica de importantes fatores ligados ao desenvolvimento do feto, da gestação e do parto (PERECIN, 2007; PERECIN *et al.*, 2009), o desenvolvimento embrionário está diretamente ligado à qualidade oocitária (ANGUITA *et al.* 2007).

Nesse sentido, diferentes substâncias têm sido testadas durante a etapa de MIV, entre elas: hormônios esteróides, protéicos e ácidos graxos (BECKER *et al.*, 2002; MINGOTI *et al.* 2002; SIRARD *et al.*, 2007), fatores de crescimento (HUSSEIN *et al.*, 2006; JOUSAN *et al.*, 2008) e antioxidantes (LANE e GARDNER, 1997; LIU *et al.*, 2003), buscando melhorar as taxas de desenvolvimento embrionário.

Apesar de não estar totalmente elucidado, sabemos que fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento epidermal - EGF, o fator-I de crescimento semelhante à insulina - IGF-I, o fator de crescimento e diferenciação 9 - GDF9 e a proteína morfogenética óssea 15 - BMP15 (KNIGHT e GLISTER, 2003) são indispensáveis para que a maturação do oócito ocorra de maneira adequada.

2.2. Maturação oocitária *in vivo* e *in vitro*

Em mamíferos, o crescimento folicular, a formação do antro (HUSSEIN *et al.*, 2006) e a maturação oocitária (COLEMAN *et al.*, 2007) são regulados por células somáticas, que produzem vários fatores parácrinos moduladores do desenvolvimento do oócito.

Durante o processo de desenvolvimento folicular, os oócitos passam por diversas fases de crescimento, e no estágio dictióteno adquirem a habilidade de sofrer a redução meiótica, ou seja, adquirem competência para completar o processo meiótico (LONERGAN *et al.*, 1999).

Apesar de serem processos distintos, a maturação nuclear e a maturação citoplasmática são eventos interligados e que ocorrem de modo simultâneo em determinados momentos, embora a programação molecular do citoplasma tenha início ainda na fase de crescimento do oócito (BREVINI-GANDOLFI e GANDOLFI, 2001).

O processo de maturação nuclear tem início com a dissolução da membrana nuclear e condensação da cromatina, desintegração do envoltório nuclear e formação do fuso, em um processo denominado rompimento da vesícula germinativa. A progressão meiótica passa pelos estádios de metáfase I, anáfase I, telófase I, prófase II e progride até a metáfase II - MII, quando ocorre a segunda interrupção meiótica (BEVERS e IZADYAR, 2002).

Em relação à maturação citoplasmática, a mesma pode ser subdividida em três eventos principais: 1) redistribuição das organelas citoplasmáticas; 2) dinâmica dos filamentos do citoesqueleto; e 3) maturação molecular (FERREIRA *et al.*, 2009). A maturação citoplasmática pode ser descrita como o conjunto de alterações estruturais e biológicas que permitam a fecundação do oócito e o desenvolvimento embrionário (AVELINO, 2004), isto acontece quando este se aproxima do estágio de M II (DAMIANI *et al.*, 1996). A primeira evidência de competência citoplasmática ocorre quando o oócito interrompe a fase de preparação, modificando os mecanismos de transcrição e tradução (FAIR *et al.*, 1995).

Durante a maturação citoplasmática ocorre a organização do citoplasma, incluindo a redistribuição de organelas como mitocôndrias (ADONA *et al.*, 2008),

ribossomos (FAIR *et al.*, 2001), microtúbulos (CAN *et al.*, 2003), complexo de Golgi (PAYNE *et al.*, 2003), retículo endoplasmático (FITZHARRIS *et al.*, 2007) e grânulos corticais (CARNEIRO *et al.*, 2002) (Fig 1.).

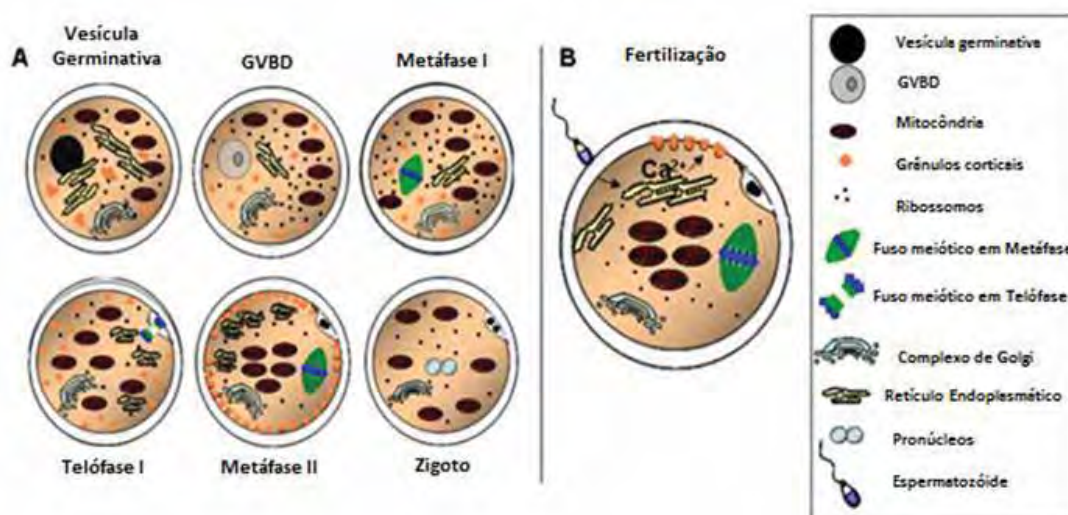


Figura 1. Esquema da distribuição das organelas citoplasmáticas durante a maturação, fertilização e formação do zigoto bovino. **A.** Progressão da maturação nuclear e movimentação das organelas citoplasmáticas, desde o estágio imaturo de vesícula germinativa até a maturidade plena, em metáfase II, e estágio de formação do zigoto; **B.** Distribuição das organelas e o mecanismo de liberação do conteúdo dos grânulos corticais, secundário à liberação do cálcio (Ca^{2+}) intracelular, engatilhado pela penetração do espermatozoide, na fertilização (FERREIRA *et al.*, 2009).

A distribuição das mitocôndrias durante a maturação está bem caracterizada em oócitos de mamíferos. Em estágio de vesícula germinativa, as mitocôndrias são encontradas predominantemente na periferia do citoplasma e com pequenos grupos dispersos mais ao centro do oócitos (HYTTEL *et al.*, 1997), enquanto que em estágio de MII, as mitocôndrias ocupam posição mais centralizada no citoplasma (ADONA *et al.*, 2008; DE LOS REYES *et al.*, 2011).

Os ribossomos são sintetizados pela transcrição de genes de rRNA (RNA ribossomal) e permanecem quiescentes até o momento anterior à quebra da vesícula germinativa, durante a meiose, quando ocorre um aumento da síntese de proteínas no estágio de metáfase I, com posterior redução até níveis basais ao alcançar o estágio de metáfase II (FAIR *et al.*, 2001; HYTTEL *et al.*, 2001). Essa redução pode ser justificada pela ausência do nucléolo funcional, uma vez que a cromatina está condensada em

forma de cromossomos e, assim, não haveria a transcrição de rRNA e a consequente produção de ribossomos para a tradução do mRNA (TOMEK *et al.*, 2002).

Durante a maturação do oócito de mamíferos é formada uma rede de microtúbulos somente próxima ao DNA condensado e não detectada no citoplasma (CAN *et al.*, 2003). Os centrossomos são responsáveis pela regulação coordenada da intensa reorganização dos microtúbulos durante os eventos nucleares e citoplasmáticos (BREVINI *et al.*, 2007), sugerindo que a rede de microtúbulos deve estar relacionada à habilidade do oócito em proporcionar o desenvolvimento do embrião (GOTTARDI, 2009).

Com relação ao complexo de Golgi, estudos têm sugerido que a ação secretória não é essencial para o desenvolvimento embrionário (PAYNE *et al.*, 2003), já que com o processo de maturação esta organela tende a reduzir o seu tamanho de forma significativa, até ser quase impossível de ser localizada no estágio de MII (HYTTEL *et al.*, 1997).

A organização do retículo endoplasmático durante a maturação de oócitos é um processo complexo sustentado por diferentes componentes do citoesqueleto. Inicialmente ocorre o acúmulo do retículo endoplasmático em torno do eixo durante a quebra da vesícula germinativa, dependente dos microtúbulos. Posteriormente, ocorre a remodelação do retículo endoplasmático na forma de *clusters* na fase de MII e essa fase é dependente dos microfilamentos e não mais dos microtúbulos. Para que o oócito esteja apto para a fertilização, é necessário que haja coordenação entre todas as modificações citoplasmáticas e nucleares (FITZHARRIS *et al.*, 2007).

Segundo Sirard (2001) e Carneiro *et al.* (2002), o padrão de distribuição dos grânulos corticais (GC) no oócito é um importante indício de maturação citoplasmática, podendo ser utilizado como critério para avaliar a maturação e a organização citoplasmática do oócito, uma vez que a migração dos GC para a periferia do oócito está associada à reorganização das organelas citoplasmáticas, no que refere ao número, tamanho e/ ou posição.

A principal importância dos GC consiste em auxiliar no bloqueio à polispermia. A liberação do seu conteúdo resulta em uma reorganização extensa da zona pelúcida (ZP) e/ou reação cortical da superfície vitelina, resultando em alterações bioquímicas, e

também na liberação de enzimas que provocam o endurecimento da ZP e a inativação dos receptores espermáticos (KUPKE *et al.*, 1998).

A maturação molecular é o terceiro estágio de amadurecimento, mas que pode ser entendido como parte final do processo de maturação citoplasmática (FERREIRA, 2009). Durante a maturação molecular ocorre a transcrição, o armazenamento e o processamento dos mRNAs expressos pelos cromossomos, que serão, posteriormente, traduzidos em proteínas pelos ribossomos, com o objetivo de preparar o oócito para os eventos pós-fertilização (SIRARD, 2001).

Os genes responsáveis por codificarem produtos vitais para o desenvolvimento inicial do embrião, como mRNA e proteínas, são de origem oocitária e atuam geralmente até a fase de transição materno zigótica, sendo os mais conhecidos o *Maternal Antigen That Embryo Requires* (MATER) e o *Zygote Arrest 1* (Zar1) (LINDEMAN e PELEGRI, 2009).

Diferentemente do ambiente *in vivo*, a retirada mecânica do oócito do ambiente folicular com posterior maturação *in vitro* em meio adequado, é suficiente para que ocorra a retomada espontânea da meiose, enquanto que a maturação citoplasmática ocorre de maneira mais lenta e gradativa (GORDON, 1994). Sob condições *in vitro* essas duas etapas da maturação tendem a ocorrer em momentos diferentes, resultando baixa viabilidade oocitária e baixa taxa de fertilização (SIRARD *et al.*, 1995; BEVERS *et al.*, 1997).

Dessa forma, buscando uma sincronia entre os dois processos de maturação, têm sido utilizados métodos celulares e bioquímicos para inibir, em um primeiro momento, o reinício da meiose dos oócitos após sua retirada do ambiente folicular, visando melhorar o desenvolvimento citoplasmático e molecular na ausência de maturação nuclear (SIRARD, 2001).

Muitos estudos têm sido voltados para a maturação oocitária *in vitro* (GOTTARDI, 2009, PEREIRA *et al.*, 2010; PRENTICE *et al.*, 2011), no entanto, os oócitos maturados *in vivo* apresentam maior homogeneidade em nível ultra-estrutural. Os oócitos produzidos *in vitro*, por sua vez, apresentam assincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática (RIZOS *et al.*, 2002; DE LOS REYES *et al.*, 2011).

Diversos fatores biológicos atuam de forma conjunta na preparação do oócito imaturo para que este se torne competente e passível de posterior desenvolvimento embrionário (YANG *et al.*, 1998). Dessa forma, mesmo os oócitos que apresentem maturação nuclear adequada, em tempo regular, mas que não apresentam sincronia entre a maturação citoplásmica e a nuclear, não serão fecundados, e caso ocorra a fecundação, não apresentarão desenvolvimento embrionário adequado (SIRARD e BLONDIN, 1996; BEVERS *et al.*, 1997).

Além disso, oócitos submetidos à maturação *in vitro* possuem quantidade de transcritos de origem oocitária alterada quando comparados a oócitos maturados *in vivo*, o que pode significar menor quantidade de transcritos disponíveis para uso posterior à fecundação, durante o desenvolvimento embrionário inicial (PEREIRA *et al.*, 2010).

Dada às dificuldades encontradas, as condições de cultivo *in vitro* têm sido constantemente manipuladas com o propósito de melhorar a capacitação do oócito após sua retirada do ambiente folicular (GONÇALVES *et al.*, 2008).

No ambiente *in vitro*, para que ocorra a adequada maturação do oócito, é necessário que haja interação entre o meio de cultivo e a concentração de determinadas substâncias (COLEMAN *et al.*, 2007). Glicose (COLEMAN *et al.*, 2007), óxido nítrico (VIANA *et al.*, 2007), FSH (SIRARD *et al.*, 2007), estradiol (BECKER *et al.*, 2002), leptina (ARIAS-ALVAREZ *et al.*, 2011), glutatona (FURNUS *et al.*, 2008), fluido folicular (AVERY *et al.*, 2003; COLEMAN *et al.*, 2007), e fatores de crescimento EGF, IGF-I, BMP15 e GDF9 (HUSSEIN *et al.*, 2006, JOUSAN *et al.*, 2008) têm sido utilizados para suplementar o meio base da maturação *in vitro*, com o objetivo de melhorar as taxas de desenvolvimento embrionário.

2.3. A Superfamília TGF- β

Os fatores de crescimento têm papel fundamental na migração das células germinativas para a crista gonadal e são, portanto, essenciais para desencadear todo o processo de oogênese e foliculogênese (HALM *et al.*, 2008), além de atuarem no recrutamento folicular, na proliferação/atresia das células da granulosa e células da teca, na esteroidogênese, na maturação oocitária, na ovulação e na luteinização (FATEHI *et al.*, 2005).

De acordo com Kayani *et al.* (2009), os fatores intra-ovarianos da superfamília TGF- β são sintetizados pelas células foliculares da teca e granulosa e atuam como fatores autócrinos e parácrinos de crescimento e desenvolvimento folicular (fig. 2).

A superfamília TGF- β é composta por mais de 30 moléculas sinalizadoras intracelulares, classificadas de acordo com sua estrutura e funcionalidade. Incluem três isoformas de TGF- β (1, 2 e 3), hormônio anti-mulleriano (AMH), duas inibinas (A e B), três ativinas (A, B e AB), 20 proteínas morfogenéticas do osso (BMP1 a BMP 20) e nove fatores de diferenciação de crescimento (GDF1 a GDF9), que podem ser descritos como um subgrupo das BMPs (KNIGHT e GLISTER, 2003; JUENGEL *et al.*, 2005).

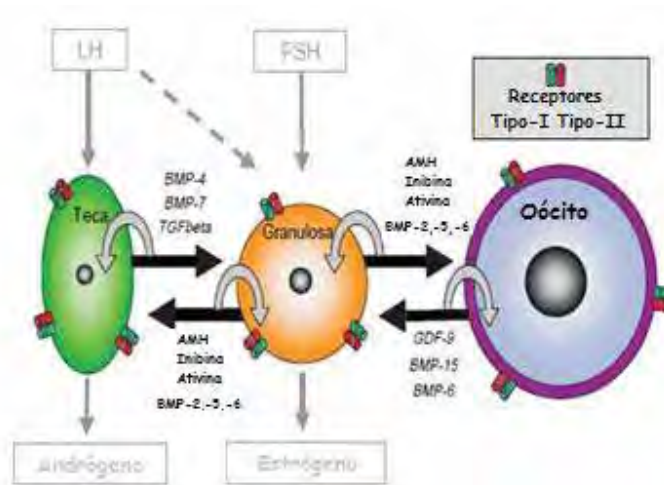


Figura 2. Membros da superfamília TGF- β envolvidos na comunicação bi-direcional entre as células da teca e granulosa e entre as células da granulosa e os oócitos. Ambas por meio das vias autócrina (setas cinzas) e parácrina (setas pretas), dependendo das combinações adequadas da expressão de receptores na superfície celular do tipo I e tipo II (KNIGHT e GLISTER, 2006).

A família TGF- β , em especial a BMP15 e GDF9, tem sido identificada como essencial para o desenvolvimento folicular normal na maturação pré-ovulatória de folículos, interferindo no tamanho do folículo e na taxa de ovulação (SHIMASAKI *et al.*, 2004).

Os fatores de crescimento GDF9 e BMP15 têm como alvo as células somáticas da granulosa e da teca, e atuam estimulando o crescimento dos folículos ovarianos. O GDF9 e BMP15 são captados pelas células da teca e granulosa e seus efeitos mediados por receptores específicos de superfície de membrana, que são divididos em dois subtipos: tipo I e tipo II, por meio da via intrínseca serina/treonina quinase (KAYANI *et al.*, 2009). O mesmo receptor do tipo II (BMPRII) participa da sinalização do GDF9 e BMP15, que se diferenciam pelo receptor tipo I, sendo o ALK5 responsável pela sinalização do GDF9. (ELIS *et al.*, 2008, RUA *et al.*, 2009).

2.3.1 Fator de Diferenciação de Crescimento 9 (GDF9)

O GDF9 (fator de diferenciação de crescimento-9) foi identificado no início da década de 90 (MCPHERRON e LEE, 1993), e assim como os outros membros da superfamília TGF- β é sintetizado como um peptídeo precursor, dividido em: peptídeo sinal, pré-peptídeo e peptídeo maduro, biologicamente ativo (KNOBIL e NEILL'S, 2006).

Após a remoção do sinal peptídico, a pró-proteína sofre dimerização e é posteriormente clivada por enzimas proteolíticas em um sítio específico, resultando na geração da proteína madura bioativa (SHIMASAKI *et al.*, 2004). Durante a dimerização, a região madura da GDF9 pode se ligar a outra molécula idêntica, formando homodímeros, ou a outro membro da superfamília TGF- β , caracterizando a formação de heterodímeros (revisado por LIMA *et al.*, 2010).

Na fase pré-antral, GDF9 tem se mostrado eficaz em estimular o crescimento de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* de ratos (HAYASHI *et al.*, 1999). O GDF9 também promove o crescimento dos folículos pré-antrais em ovários humanos (HREINSSON *et al.*, 2002). Na transição para a fase antral, parece que o GDF9 promove a sobrevivência folicular por promover apoptose das células da granulosa e suprimir a atresia folicular (ORISAKA *et al.*, 2006).

Além de participar da evolução do folículo primordial para primário, essa proteína também exerce importante função nos estágios mais avançados do desenvolvimento folicular, aumentando a produção de ciclo-oxigenase 2 (COX2), StAR, ativador do plasminogênio e do receptor do LH (ELVIN *et al.*, 1999; VITT *et al.*, 2000).

O GDF9 atua na proliferação das células da granulosa, na esteroidogênese tecal ao mesmo tempo em que evita a luteinização prematura, por meio da inibição do AMPc (YAMAMOTO *et al.*, 2002; SPICER *et al.*, 2008). O AMPc dentre outras funções, promove a esteroidogênese e aumenta a expressão da proteína reguladora aguda da esteroidogênese - StAR, que é expressa tanto nas células da teca quanto nas células da granulosa. A proteína StAR é responsável pelo transporte do colesterol da membrana externa da mitocôndria para a interna, onde se localizam a maioria das enzimas envolvidas na esteroidogênese.

A redução do AMPc por meio do GDF9 também atua estimulando a síntese de P450 aromatase, esta por sua vez transforma a testosterona produzida pelas células da teca em estradiol. O estradiol é capaz de modular o padrão pulsátil de GnRH e conseqüentemente modular a síntese de FSH e LH. Sendo assim o GDF9 estimula indiretamente a produção de estradiol e suprime a produção de FSH (VITT *et al.*, 2000).

As células da granulosa, diferentemente das células da teca, apresentam RNAm do gene GDF9. Nessas células, os níveis de RNAm de GDF9 são muito superiores em folículos pequenos quando comparados aos folículos grandes. Por outro lado, as células da teca de folículos pequenos são mais responsivas tanto ao efeito proliferativo celular, quanto ao efeito inibitório da esteroidogênese tecal (SPICER *et al.*, 2008) resultante da ação do GDF9.

Nas células da teca o GDF9 atua estimulando a proliferação de células da teca, inibindo o IGF-1 e o LH induzido por meio da síntese de progesterona e androstenediona (OTSUKA *et al.* 2011), fundamentais para promover o crescimento dos folículos pré-antrais para a fase inicial antral (ORISAKA *et al.*, 2009).

O efeito biológico do GDF9 ocorre após ligação com dois tipos de receptores, BMPR-II e ALK5 (ELIS *et al.*, 2008, RUA *et al.*, 2009). A proliferação (GILCHRIST *et al.*, 2006) e a regulação da expressão gênica das células do *cumulus* ocorrem por meio da síntese de COX2 e ácido hialurônico 2, resultando na expansão do *cumulus* (ELVIN *et*

al, 1999) e, por consequência, no crescimento do folículo (VITT *et al.*, 2000; JUENGEL *et al.*, 2009).

O GDF9 também está envolvido na interconexões entre oócitos e células do *cumulus* adjacentes e regula a absorção de aminoácidos, a glicólise e a biossíntese de colesterol das células *cumulus* via junções ao oócito (SU *et al.*, 2008; JEE *et al.*, 2011).

Antes do pico de LH, as células *cumulus* necessitam do GDF9 para dar suporte às cascatas metabólicas, tais como glicólise e biossíntese de esterol (SUGIURA *et al.*, 2005). Além de regulação do metabolismo das células *cumulus*, o GDF9 controla diversos processos e expressão gênica durante o estágio pré-ovulatório (OTSUKA *et al.* 2011)

Existe uma relação significativa entre a maturação nuclear e os níveis de GDF9 maduro, que apoia o papel fundamental desse fator parácrino no desenvolvimento do oócito. O aumento do nível da forma madura de GDF9 no FF correlaciona-se com a maturação nuclear dos oócitos e qualidade dos embriões (GODE *et al.*, 2011). E devido ao fato do GDF9 ser secretados pelo oócito em si, esses fatores podem ser preditores mais confiável de maturação do oócito. Em estudos *in vitro* utilizando GDF9 recombinante apoiam estes achados (MOTTTERSHEAD e WATSON, 2009).

A administração exógena de GDF9 é capaz de modular a função esteroidogênica de células da granulosa. O GDF9 tem sido utilizado para estimular a produção de inibina nas células da granulosa (GODE *et al.*, 2011).

No entanto, achados em ratos, mostraram que GDF9 estimula a expressão de receptores para FSH (rFSH) em folículos pré-antrais (ORISAKA *et al.*, 2006) e em cultivo das células da granulosa de folículos antrais iniciais sugerindo que a inibição das ações do FSH por meio do GDF9 ocorre por meio da modificação das vias de sinalização do receptor, promovendo a produção de progesterona pelas células *cumulus*, estimulando a expressão de um receptor via intrínseca prostaglandina-E2/EP2 sinalização (ELVIN *et al.*, 1999).

Com o propósito de ampliar os conhecimentos relacionados ao GDF9, foi desenvolvida a proteína recombinante humana GDF9, a qual possui a função de promover a mucificação e conseqüente expansão das células do *cumulus*. No entanto,

ainda não está totalmente esclarecido o mecanismo capaz de neutralizar a mucificação prematura nos folículos pré-antrais *in vivo* (revisado por GILCHRIST *et al* 2004).

Em um experimento utilizando a proteína hGDF9 produzida de forma latente a partir de células 293T, foi constatado que após um processo de purificação, a proteína hGDF9 torna-se um fator mitogênico das células da granulosa, controlado pelo oócito por meio da via Smad3 (MOTTERSHEAD *et al.*, 2008).

Um estudo utilizando a concentração de 50ng da proteína GDF9 demonstrou a capacidade da proteína em promover o crescimento de folículos primários e a proliferação de células da teca em ratas (NILSON e SKINNER, 2002). Na concentração de 200ng, o GDF9 mostrou-se capaz de estimular a manutenção da viabilidade folicular e a proliferação de células da granulosa em humanos (HREINSSON *et al.*, 2002) e de exercer efeito sinérgico com o FSH sobre o crescimento e a diferenciação de folículos pré-antrais em murinos (HAYASHI *et al.*, 1999).

2.4. Fluido Folicular

O fluido folicular (FF) é uma solução ligeiramente viscosa com pH em torno de 7,4, semelhante ao plasma sanguíneo, constituído por grande variedade de componentes, sendo sintetizado por células especializadas do microambiente folicular (KLUMPP, 2004). Os componentes bioquímicos do FF são essenciais para a fisiologia ovariana, incluindo esteroidogênese, crescimento folicular, maturação final dos oócitos, ovulação e transporte do oócito pelo oviduto (FAHIMINIYA e GERARD, 2010).

Considerando que durante o processo de maturação oocitária *in vivo* o oócito está submerso em fluido folicular (CAILLAUD *et al.*, 2008), a sua utilização como componente do meio maturação pode contribuir para melhorar as taxas de maturação *in vitro* (AGUILAR *et al.*, 2001), na tentativa de se mimetizar as condições fisiológicas obtidas *in vivo*.

A suplementação do meio de maturação com fluido folicular resulta em uma melhoria da capacidade de desenvolvimento de oócitos bovinos (ROMERO-ARREDONDO E SEIDEL, 1996), equinos (DELL'AQUILA *et al.*, 1997) e suínos (AGUNG *et al.*, 2010), pois aumenta o grau de expansão das células do *cumulus*

(AGUILAR *et al.*, 2001), a porcentagem de oócitos que atingem a metáfase II (BOGH *et al.*, 2002) e conseqüentemente, as taxas de desenvolvimento embrionário (ALGRIANY *et al.*, 2004).

Existem relatos de que a suplementação com 5% FF favorece o desenvolvimento de oócitos imaturos até o estágio de blastocisto após fertilização *in vitro* (ALI *et al.*, 2004) e na proporção de 10% aumenta as taxas de clivagem e de blastocistos (KIM *et al.*, 1996).

Elmileik *et al.* (1995), utilizando proporções de 10 a 20% de FF, não encontraram efeito significativo sobre a maturação nuclear dos oócitos, no entanto, verificaram que o desenvolvimento de blastocistos e a taxa de eclosão foram aumentados de forma significativa. Da mesma forma, Isobe e Terada (2001), observaram que o FF nessa proporção contribui de forma positiva na formação do pronúcleo masculino após a fertilização *in vitro*.

Em búfalas, a suplementação utilizando uma concentração entre 20 e 40% de fluido folicular teve efeito estimulatório sobre a retomada da meiose, expansão do *cumulus* e maturação citoplasmática com posterior desenvolvimento até os estádios de mórula e blastocisto, após a fertilização *in vitro* (CHAUHAN 1997).

Elmileik *et al.* (1995) e Kim *et al.* (1996) demonstraram que o FF na proporções de 50 e 60% tem efeito negativo sobre o desenvolvimento embrionário, sugerindo que a elevação da concentração do FF de forma brusca promove alterações das vias metabólicas no oócito durante a maturação, já que sob condição *in vivo*, as modificações do ambiente folicular ocorrem de maneira gradual.

Entretanto, ainda há controvérsias quanto a real contribuição do FF para o desenvolvimento embrionário. Existem alguns relatos de que o uso do FF como meio de maturação, embora seja suficiente para promover a maturação nuclear, não possibilita um desenvolvimento embrionário adequado (AVERY *et al.* 2003, COLEMAN *et al.*, 2007). Portanto, maiores estudos são necessários para a maior compreensão da ação dessa substância sobre o desenvolvimento *in vitro* de oócitos e embriões.

2.5 Fertilização *in vitro*

A fertilização é um processo complexo que envolve eventos moleculares entre células maduras haploides femininas e masculinas, capazes de se reconhecerem mutuamente e se unirem, originando o genótipo de um novo indivíduo (KUPKE *et al.*, 1998).

Para que ocorra a fecundação dos oócitos, os espermatozoides precisam sofrer, previamente, um processo chamado de capacitação (MATÁS *et al.*, 2010). A capacitação espermática envolve múltiplas etapas, ainda não bem compreendidas, dentre elas a modificação das características da membrana, atividade enzimática, e motilidade dos espermatozoides, que são necessárias para torná-los reativos aos estímulos que induzem a reação acrossômica antes da fertilização (GURAYA, 2010).

Fisiologicamente a capacitação ocorre no trato reprodutivo da fêmea por meio dos glicosaminoglicanos, os quais conferem ao espermatozoide a capacidade de ganho de motilidade hiperativa, interação com a zona pelúcida do oócito e de iniciar a fusão com o oócito por meio da reação acrossômica (KNOBIL e NEILL, 2006).

Sob condições *in vitro*, para que a capacitação ocorra é necessário que sejam fornecidas condições de cultivo, semelhantes às que ocorreriam *in vivo*, com o intuito de facilitar e proporcionar as necessárias alterações da membrana (GONÇALVES *et al.*, 2008). Os agentes capacitores mais utilizados atualmente são a heparina (THERIEN *et al.*, 1997) e o cálcio ionóforo (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2002).

Na etapa de fertilização *in vitro*, é necessário que os espermatozoides superiores sejam separados do plasma seminal, crioprotetores, e das células mortas. Com a finalidade de promover separação espermática, a centrifugação em gradiente de percoll e o *swim-up* têm sido os métodos mais utilizados (COELHO *et al.*, 2000).

Após a fusão de gametas ocorre a reação cortical e a retomada da meiose. A reação cortical promove o endurecimento da ZP e a inativação dos receptores espermáticos, resultando no bloqueio à poliespermia. A reação ocorre por meio de enzimas hidrolíticas, proteases e peroxidases liberadas pelos grânulos corticais no espaço perivitelíneo e na superfície interna da zona pelúcida (KUPKE *et al.*, 1998).

Imediatamente após a ligação do espermatozoide à zona pelúcida, ocorre aumento dos níveis de cálcio livre levando à degradação das proteínas chamadas MOS ou fator citostático por meio da MAPK. Com os baixos níveis dessas quinases, ocorre a retomada da meiose e a conclusão da oogênese com a extrusão do segundo corpúsculo polar (DUPRÉ *et al.*, 2011).

2.6. Cultivo *in vitro* de embriões

O meio de cultivo utilizado na produção *in vitro* de embriões afeta diretamente o desenvolvimento após a fecundação, interferindo no metabolismo e na expressão de importantes genes para o desenvolvimento do embrião (DANIELS *et al.*, 2000).

Os meios de cultivo utilizados para a PIVE são classificados como definidos, semi-definidos e indefinidos (MOZZAQUATRO *et al.*, 2004). Os meios definidos são livres de soro ou outro material biológico. Os meios indefinidos são aqueles cuja composição apresenta alguma substância de origem biológica, e os semi-definidos são meios intermediários (GORDON, 1994). Os embriões bovinos normalmente são cultivados em meios com condições indefinidas, já que a suplementação com proteína de origem animal tem se mostrado benéfica para o seu desenvolvimento (GOMEZ e DIEZ, 2000).

A embriogênese inicial é um processo complexo no qual o desenvolvimento embrionário é dependente das transcrições maternas até o momento em que haja a ativação do genoma embrionário (DURANTHON *et al.*, 2008; FEUGANG *et al.*, 2009).

A ativação do genoma embrionário em bovinos ocorre no estágio de 8 para 16 células e é conhecida como “transição materno zigótica” (FOULADI-NASHTA *et al.*, 1998). Em muitas espécies, a transcrição deficiente do genoma durante essa fase leva ao bloqueio do desenvolvimento embrionário (GONÇALVES *et al.*, 2007).

In vivo, os embriões são envoltos por fluido, do oviduto e do útero, composto por gotas de oxigênio e substratos metabólicos necessários para o crescimento e a sobrevivência embrionária. O desenvolvimento embrionário inicial depende da produção de energia, por via metabólica, para que seja assegurada a sua continuidade por todos os estádios até o momento da implantação (HARVEY, 2007).

Estudos comparativos entre embriões produzidos *in vitro* com os seus homólogos *in vivo* mostram diferenças morfológicas, estruturais, bioquímicas e metabólicas (KNIJN *et al.*, 2003). Essas diferenças, devido a efeitos profundos sobre os padrões de expressão do mRNA de importantes genes dos embriões cultivados *in vitro*, podem levar a menor capacidade de desenvolvimento embrionário (WRENZYCKI *et al.*, 2001), menor qualidade embrionária e, conseqüentemente, menor taxa de prenhez (PETERSON *et al.*, 2003).

No processo de desenvolvimento, as células embrionárias se diferenciam em trofoblasto (TF) e células da massa celular interna (MCI). O TF é composto por células externas do blastocisto que originam as membranas extra-embrionárias, enquanto que as células da MCI originam o feto e contribuem em parte, para a formação das membranas extra-embrionárias (NEUBER *et al.*, 2002).

O desenvolvimento fetal normal é dependente do número de células totais do embrião (LANE e GARDNER, 1997), e o estabelecimento de uma proporção adequada entre MCI:TF é considerado essencial para assegurar a viabilidade embrionária (FLEMING, 1987). Embora não se tenha um parâmetro ideal para essa razão, tem sido adotada a proporção de uma célula da MCI para duas de TF (AVELINO, 2004).

A qualidade embrionária pode ser avaliada com base no índice de células apoptóticas (NEUBER *et al.*, 2002; KNIJN *et al.*, 2003), no entanto a avaliação mais utilizada é por meio da coloração diferencial de células da massa celular interna e do trofoblasto, a qual verifica a relação entre o número de células da massa celular interna e as células do trofoblasto, e número total de células do blastocisto.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a influência do fluido folicular, associado ou não à proteína recombinante humana GDF9, no meio de maturação sobre a produção e qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência do fluido folicular puro e associado ao TCM 199 em diferentes proporções sobre a maturação citoplasmática e nuclear do oócito, e o desenvolvimento embrionário;
- Avaliar o efeito da adição da proteína recombinante humana GDF9 em meio de maturação sobre os parâmetros de clivagem e porcentagem de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*;
- Avaliar a associação entre o fluido folicular e a proteína recombinante humana GDF9 durante o período de maturação sobre o desenvolvimento e a qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

4. MATERIAL E METODOS

4.1. Local e período do estudo

O estudo, dividido em quatro experimentos, foi realizado no Laboratório de Produção *in vitro* de embriões do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista - UNESP, em Jaboticabal – São Paulo, durante o período de agosto de 2010 a agosto de 2011.

4.2. Obtenção dos ovários

Foram utilizados oócitos oriundos de ovários bovinos coletados post-mortem no frigorífico Barra Mansa, localizado no município de Sertãozinho, SP. Os ovários foram acondicionados em garrafas térmicas, mantidos à temperatura de 30-33 °C, e transportados para o laboratório, em torno de quatro horas do início da colheita, com distância aproximada de 35 km. Momentos antes da aspiração, os ovários foram lavados com solução salina a aproximadamente 33 °C.

4.3. Obtenção e estocagem do Fluido Folicular (FF)

Folículos com diâmetro entre 8 e 15 mm de aparência clara e de boa irrigação sanguínea foram aspirados com seringa descartável e agulha de 20G. O fluido aspirado foi depositado no volume máximo de 10 mL em tubo de poliestireno contendo 50 UI de heparina sódica. Os tubos contendo líquido folicular foram centrifugados a 2.840xg por 7 minutos, e o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,20 µm, dividido em alíquotas de um mL, acondicionado em microtubo, sendo os mesmos mantidos a -20 °C até o momento de uso.

4.4 Obtenção e seleção dos complexos de células do *cumulus* e oócitos

O conteúdo de folículos de 3 a 8 mm foi aspirado com seringa descartável e agulha de 20G e depositado em tubos cônicos de 50 mL, mantidos em banho-maria a 33 °C. Terminada a aspiração, os tubos foram mantidos em repouso por 15 minutos para a sedimentação. Os complexos de células do *cumulus* e oócitos (COCs) foram localizados e depositados em meio de lavagem (Anexo 2). Os oócitos foram lavados mais duas vezes em meio de lavagem e classificados quanto ao aspecto morfológico em GI, GII, GIII, desnudos e atrésicos.

4.5. Maturação *in vitro* de oócitos

Os oócitos selecionados como GI e GII foram lavados uma vez no mesmo meio destinado a maturação TCM199 (Anexo 3). Posteriormente, foram distribuídos aleatoriamente, de acordo com os tratamentos, em número de 20 a 25 oócitos por microgota em placa de maturação. As placas de maturação foram devidamente identificadas e mantidas em incubadora a 38,5 °C e 5% de CO₂ em ar e umidade alta, por tempos variáveis (22 a 28 horas) para avaliação da maturação ou para a fecundação.

4.6. Avaliação da maturação oocitária

A maturação oocitária foi avaliada pela progressão nuclear para o estágio de MII (maturação nuclear), e pela migração dos grânulos corticais (GC) para a periferia da membrana citoplasmática (indício de maturação citoplasmática).

Para avaliação do estágio da progressão nuclear e coloração dos GC foi utilizada a metodologia descrita por Cherr *et al.* (1988) e Avelino (2004), com algumas modificações.

Para a avaliação do estágio da progressão nuclear após maturação por 22, 24, 26 e 28h, foi realizada a remoção das células do *cumulus*, com 0,2% de hialuronidase (Hyalozima®, Aspen) em solução salina com tampão fosfato livre de Ca²⁺ e Mg²⁺ (PBS

Ca²⁺ e Mg²⁺ free). Em seguida, os oócitos foram lavados 3 vezes em meio de lavagem, corados com 10 µg/mL de Hoechst 33342 (Anexo 21) em meio de lavagem por 15 minutos, lavados novamente em PBS, montados em lâminas e visualizados em microscópio de epifluorescência (excitação 330-385nm e emissão 420-490nm para o Hoechst, Olympus – IX-FLA-70, Tóquio, Japão). Os oócitos foram classificados quanto à maturação nuclear pelo estágio de progressão nuclear e foram considerados maduros quando se encontravam no estágio de MII.

Para a avaliação dos GC, após maturação por 22, 24, 26 e 28h, foi realizada a remoção das células do *cumulus*, com 0,2% de hialuronidase (Hyalozima®, Aspen) em PBS Ca²⁺ e Mg²⁺ free, e a remoção da zona pelúcida com solução tyrodes ácida (Anexo 22) por 10 seg, à temperatura ambiente.

Posteriormente à remoção da ZP, os oócitos foram fixados em 3% de formaldeído (Anexo 23), por 30min à temperatura ambiente, e incubados a 4°C durante a noite, em solução de bloqueio – SB (Anexo 24).

Para a permeabilização, os oócitos foram tratados por 3 min a 38°C em solução de bloqueio (SB) acrescida de 0,1% de Triton X-100 (Anexo 25). Posteriormente, foram incubados por 15 min a 38°C em 10µg/mL de *Lens culinaris* aglutinina conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC-LCA, Anexo 27); esta lecitina se liga especificamente à α- D-manose presente nos GC. Em seguida, os oócitos foram lavados três vezes em SB, montados em lâminas e visualizados em microscópio de epifluorescência (excitação 460-490nm e emissão 515nm, para o FITC).

Quanto à maturação citoplasmática, os oócitos foram classificados de acordo com a distribuição dos GC, sendo considerados imaturos aqueles com GC dispostos em “clusters” distribuídos por todo o citoplasma; parcialmente maduros ou em transição, os oócitos com GC migrando para a periferia; e maduros, aqueles oócitos com GC dispostos na periferia de forma homogênea, de acordo com a classificação de Hosoe e Shioya (1996).

4.7. Processamento do sêmen

Foram utilizadas doses de sêmen de um mesmo touro em todos os experimentos. As palhetas de sêmen (0,25mL) foram descongeladas no momento do uso, a 37°C/30 segundos. O sêmen foi depositado sobre o gradiente de Percoll 45% e 90% (Anexo 8), previamente preparado, e centrifugado a 3.600xg, durante 7 minutos. O sobrenadante foi removido e o sedimento suspenso em 600 µL de meio FIV-gotas (Anexo 14), para formação de novo sedimento após centrifugação a 510xg durante 5 minutos.

Alíquotas de 30 µL do sedimento formado foram transferidas para microtubos contendo 30 µL de FIV-gotas. Da mistura obtida (60 µL) foram transferidos 5 µL para um microtubo contendo 150 µL de meio FIV-gotas e 5 µL para um microtubo contendo 250 µL de água, para se avaliar a motilidade e a concentração espermática, respectivamente.

Os espermatozoides contidos em cinco retículos da câmara de Neubauer foram contados para se determinar o ajuste necessário para obtenção de volume final contendo 25×10^3 espermatozoides por µL. Após ajuste da concentração, foram adicionados 6 µL da suspensão de espermatozoides em cada gota contendo os oócitos maduros, o que resultou em uma concentração de 150×10^3 espermatozoides por microgota de FIV, correspondendo aproximadamente a $7,5 \times 10^3$ espermatozoides por oócito.

4.8. Fertilização *in vitro*

Os oócitos maturados após terem sido lavados duas vezes em meio TL-Sêmen (Anexo 7) e uma vez em meio FIV-gotas, foram transferidos para as gotas de fecundação e distribuídos em grupos de 20 a 25 oócitos em cada microgota, onde os espermatozoides estavam sendo capacitados. As microgotas foram agitadas, com auxílio de micropipeta, a fim de facilitar a homogeneização dos espermatozoides com os oócitos. As estruturas foram co-incubadas por 18 a 20 horas a 38,5 °C, atmosfera de 5% de CO₂ em ar para a fecundação

4.9. Cultivo *in vitro* dos embriões

Os prováveis zigotos foram transferidos da placa de FIV para uma placa de poliestireno de 35 mm de diâmetro, contendo gotas de 100 μ L de meio TL-Sêmen na qual foram submetidos a vigorosas e repetidas pipetagens até que as células do *cumulus* fossem removidas.

Posteriormente os prováveis zigotos foram lavados de duas a três vezes em meio SOF (Anexo 17) e transferidos para a placa de Cultivo *in vitro* - CIV de embriões, contendo gotas de 100 μ L de meio SOF, que por sua vez, foram mantidas em incubadoras a 38,5 °C e 5% de CO₂ em ar por seis dias. Nos dias 3 e 5 de cultivo de desenvolvimento foi removido aproximadamente 50% do meio da gota e igual volume de meio fresco foi adicionado.

4.10. Determinação das taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário

A taxa de clivagem foi determinada de 32 a 36 horas pós-inseminação, em microscópio estereoscópio (aumento de 50 X). Embriões de duas e quatro células foram considerados clivados. A taxa de desenvolvimento embrionário, até o estágio de blastocisto, foi determinada no sétimo dia após a fecundação *in vitro*.

4.11. Avaliação da qualidade embrionária

A qualidade morfológica dos blastocistos produzidos *in vitro* foi avaliada pela proporção do número de células da massa celular interna (MCI) e do trofoblasto (TF) em relação ao número total (T) de células. A determinação da MCI e TF foi baseada na técnica modificada de coloração diferencial por fluorocromo, descrita por Iwasaki *et al.* (1990).

Os blastocistos obtidos no dia 7 após a fecundação foram incubados em solução de meio TCM199 com 1% de Triton X-100 e 100 μ g/mL de iodeto de propídio (Anexo 26) por 30 segundos. Posteriormente os blastocistos foram incubados por 15 min em solução de PBS com 4% de paraformaldeído e 10 μ g/mL de Hoechst 33342. Para

finalização, foram lavados em PBS completo e fixados entre lâminas e lamínulas com glicerol.

Os blastocistos foram avaliados em microscópio de epifluorescência (com filtro de excitação de 340-380 nm e emissão de 430 nm) quanto ao número de células da MCI (núcleos com fluorescência azul, corados pelo Hoechst 33342) e do TF (núcleos com fluorescência rosa, corados tanto pelo iodeto de propídio quanto pelo Hoechst) e total de células. A média (\pm DP) do número total de células, na MCI e no TF, e a proporção MCI:TF dos blastocistos foram determinadas. Na avaliação dos blastocistos quanto à proporção de MCI:TF, foram considerados de boa qualidade aqueles embriões que apresentaram razão igual ou superior a 1:2, de acordo com classificação de Avelino (2004).

4.12. Delineamento experimental

4.12.1. Experimento 1. Efeito da adição de Fluido Folicular (FF) no meio TCM199 sobre o percentual de oócitos bovinos maduros em diferentes períodos (22 a 28 h) de maturação *in vitro*.

O experimento I foi realizado com cinco meios: sem adição de fluido folicular (T0), 25% de fluido folicular (T25), 50% de fluido folicular (T50), 75% de fluido folicular (T75) e fluido folicular puro (T100) e quatro tempos de maturação (22, 24, 26 e 28 h).

4.13.1. Experimento 2. Efeitos de diferentes momentos de fecundação (24, 26h e 28h) após MIV na presença de Fluido Folicular (FF) sobre a taxa de clivagem e o desenvolvimento de embriões bovinos.

O experimento II foi realizado com cinco meios: sem adição de fluido folicular (T0), 25% de fluido folicular (T25), 50% de fluido folicular (T50), 75% de fluido folicular (T75) e fluido folicular puro (T100) e três tempos de fecundação (24, 26 e 28 h de MIV)

4.14.1 Experimento 3. Efeito da adição da proteína recombinante humana GDF9 em associação ao fluido folicular nos meios de maturação sobre as taxas de clivagem, desenvolvimento e qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

O experimento III foi realizado com dois meios: sem adição de fluido folicular (T0), 25% de fluido folicular (T25) e quatro opções de suplementação (sem suplementação, 25ng/mL GDF9, 100ng/mL GDF9, ou 200ng/mL GDF9).

4.16. Análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4x5 no experimento I, com cinco meios (T0, T25, T50, T75 e T100) e quatro tempos de maturação (22, 24, 26 e 28 h), 5x3 no experimento II, sendo cinco meios (T0, T25, T50, T75 e T100) e três tempos de fecundação (24, 26 e 28 h de MIV), e fatorial 2x4 no experimento III, sendo dois meios (T0 e T25) e quatro opções de suplementação (sem suplementação, 25ng/mL GDF9, 100ng/mL GDF9, ou 200ng/mL GDF9).

Analisaram-se as respostas referentes ao número de oócitos maduros e taxas de clivagem e de blastocistos para cada tratamento e para cada tempo, utilizando-se o teste de Qui-quadrado (χ^2) e tabela de contingência ao nível de significância de 5%.

Para o número de células da massa celular interna (MCI), trofoblasto (TF), células totais e proporção TF/MCI, foi utilizada a análise de variância, e a comparação das médias foi feita pelo teste Tukey ao nível de significância de 5% mediante o programa estatístico SAS (2003).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Experimento 1. Efeito da proporção do Fluido Folicular (FF) no meio TCM199 sobre o percentual de oócitos bovinos maduros após 22 a 28 horas de maturação *in vitro*.

Para se determinar a melhor proporção de fluido folicular na maturação *in vitro* de oócitos bovinos, foram utilizados 3528 oócitos, sendo que para a avaliação da maturação nuclear foram utilizados 2068 oócitos, distribuídos entre os grupos experimentais em seis repetições. Do total de oócitos avaliados, 68,38% atingiram o estágio de metáfase II (Figura 3).

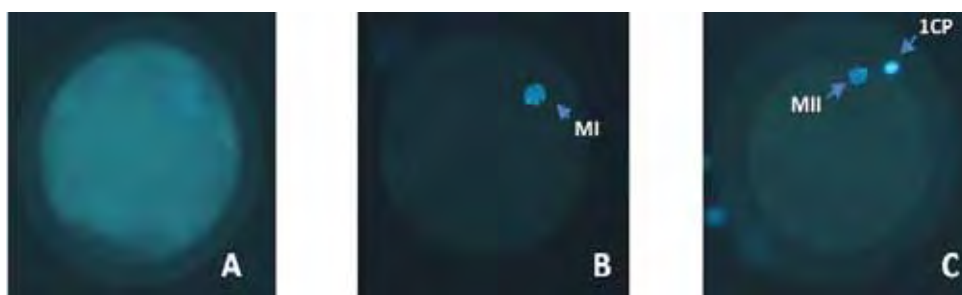


Figura 3. Aspecto morfológico da progressão nuclear em oócitos bovinos MIV por 24h, corados com Hoechst 33342 e avaliados sob microscopia de epifluorescência. (A) Oócito imaturo; (B) Oócito imaturo, (seta) apresentando metáfase I (MI), (C) Oócito maduro, (seta) apresentando metáfase II (MII) com presença do primeiro corpúsculo polar (1CP).

A proporção de fluido folicular influenciou a taxa de maturação nuclear independentemente do tempo de maturação, sendo que a taxa mais baixa (43,1%) foi obtida com a proporção de 100% de FF após 22h de maturação e a mais elevada (82,35%) com 100% de TCM199 e 28 h de maturação (Tabela 1).

De forma geral, houve redução gradual na taxa de maturação nuclear na medida em que se aumentou a proporção de FF ao meio TCM199. O meio de cultivo TCM199 (TCM199) e TCM199 acrescido de 25% de FF (TCM199 + 25%FF) mostraram-se superiores em comparação ao meio TCM199 acrescido de 75% de FF (TCM199 + 75%FF) e o FF puro (100%) ($P < 0,05$). Entretanto, a taxa de maturação nuclear obtida

com o meio TCM199 + 25%FF foi semelhante àquela verificada para o meio TCM199 em todos os tempos de maturação analisados.

Tabela 1. Taxa de maturação nuclear (TMN) de oócitos bovinos maturados *in vitro* em diferentes horários, em meio TCM199 (T0) e TCM199 acrescido de 25% (T25), 50% (T50), 75% (T75) e 100% (T100) de fluido folicular.

Tratamento	Tempo							
	22		24		26		28	
	N	TMN (%)	N	TMN (%)	N	TMN (%)	N	TMN (%)
T0	91	72,53 ^{Aa}	96	78,13 ^{Aa}	105	77,14 ^{Aa}	119	82,35 ^{Aa}
T25	104	68,27 ^{Aa}	93	77,42 ^{Aa}	94	79,79 ^{Aa}	107	75,70 ^{ABa}
T50	112	66,96 ^{Aa}	87	70,11 ^{Ab}	103	74,76 ^{Aa}	98	69,39 ^{Ba}
T75	109	54,13 ^{Ba}	106	61,32 ^{BCab}	98	69,39 ^{Ab}	107	72,90 ^{Bb}
T100	116	43,10 ^{Ba}	97	52,58 ^{Cab}	97	59,79 ^{Bbc}	129	65,89 ^{Bc}

Valores seguidos de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem pelo teste χ^2 ($P < 0,05$).

Os resultados encontrados no presente estudo diferem dos achados de estudos anteriores realizados em outras espécies. Em suínos, Agung *et al.* (2010), utilizando FF puro, encontraram taxas de maturação nuclear em torno de 90%, enquanto neste estudo verificamos taxa de aproximadamente 43% a 65% com a utilização do FF puro. Em eqüinos, Dell'Aquila *et al.*, (1997) e Bogh *et al.* (2002), utilizando FF puro, encontraram taxas de maturação de 68,5% e 79%, respectivamente.

Considerando que durante o processo de maturação oocitária ocorrem importantes alterações nucleares, a avaliação da taxa de maturação nuclear é um importante critério para avaliação da competência oocitária (PEREIRA *et al.*, 2010; PRENTICE *et al.*, 2011). No presente estudo foi verificado que em presença do FF a maturação nuclear ocorre de forma mais lenta, o que pode ter proporcionado ao oócito o tempo necessário para sintetizar, modificar e armazenar novas proteínas e ribonucleoproteínas e com isto aumentar a competência de desenvolvimento (AGUILAR *et al.*, 2001).

De acordo com Sato *et al.* (2007) e Ito *et al.* (2008), o FF contém proteínas, glicose e sais minerais, em especial Mg, que interferem na progressão da maturação nuclear e melhoram a competência oocitária.

As taxas médias de oócitos que atingiram metáfase II após 22, 24, 26 a 28 horas foram de 60,34%, 67,64%, 72,23% e 73,21%, respectivamente. Nos meios TCM199, TCM199 + 25%FF e TCM199 + 50%FF o tempo de cultivo de maturação (22 a 28 horas) não influenciou na taxa de maturação nuclear. No entanto, no meio cuja proporção de FF foi 75% ou 100%, a taxa de maturação nuclear foi mais alta após 26 e 28 horas ($P < 0,05$).

Esses resultados evidenciam que embora o acréscimo de 50% de FF no meio TCM199 tenha reduzido a taxa de maturação nuclear independente do tempo de maturação ($P < 0,05$), quando a proporção de FF foi maior que 50%, a taxa de maturação nuclear foi mais alta à medida em que o tempo de maturação foi maior ($P < 0,05$). Avery *et al.* (2003) e Coleman *et al.* (2007) avaliando a eficácia do FF como meio de cultivo, embora tenham obtido taxas de maturação menos expressivas (41% e 44%, respectivamente), também observaram que a taxa de maturação pode ser influenciada pela interação entre o tempo de maturação e a proporção de FF.

O incremento na taxa de maturação nuclear quando o oócito é mantido por mais tempo em meio de cultivo contendo proporção elevada de FF (75% e 100%) é, provavelmente, devido ao retardo da progressão meiótica, e esse atraso da meiose pode proporcionar ao oócito tempo adicional para aquisição da competência (GOTTARDI, 2009, PEREIRA *et al.*, 2010; PRENTICE *et al.*, 2011).

Por outro lado, a despeito das maiores taxas de maturação nuclear verificadas com maior tempo de maturação, na medida em que houve aumento da proporção de FF, mesmo nos tempos de 26 e 28 horas, as taxas obtidas com o FF puro foram inferiores àquelas obtidas com o meio TCM199 ($P < 0,05$).

Para a avaliação da maturação citoplasmática foram utilizados 1460 oócitos, distribuídos em grupos experimentais com seis repetições. Do total de oócitos avaliados, 33,49% apresentaram grânulos corticais (GC) dispostos na periferia de forma homogênea, ou seja, alcançaram maturação citoplasmática (Figura 4).

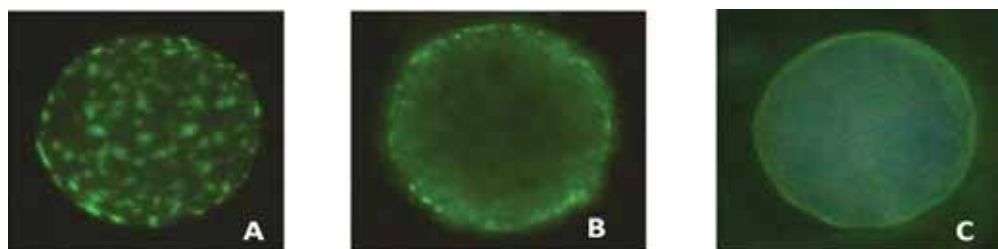


Figura 4. Aspecto morfológico da distribuição dos grânulos corticais (GC) em oócitos bovinos MIV por 24h, corados com lecitina (específica α -D-manose) conjugada a FITC, e avaliados sob microscopia de epifluorescência. (a) Oócito apresentando GC dispostos em “clusters” no citoplasma (oócito imaturo); (b) Oócito apresentando GC dispostos no citoplasma e na periferia (oócito em transição imaturo/maturo); (c) Oócito apresentando GC dispostos na periferia (oócito maturo).

A proporção de fluido folicular influenciou na taxa de maturação citoplasmática após 24 a 28 horas de maturação ($P < 0,05$), sendo que nesses tempos, a taxa mais baixa (9,59%) foi obtida com 50% de FF após 24 horas de maturação e a mais elevada (69,86%) com 75% de FF após 28 horas de maturação (Tabela 2). As taxas de maturação obtidas com a proporção de 25% de FF foram semelhantes às aquelas verificadas para o meio TCM199 nas avaliações com 26 e 28 horas de maturação.

As taxas de maturação citoplasmática, independente do meio de cultivo utilizado, foram mais baixas na avaliação com 22 horas e mais altas após 28 horas de maturação ($P < 0,05$). As taxas médias de oócitos que apresentaram maturação citoplasmática nos tempos de 22, 24, 26 a 28 horas foram de 5,29%, 23,46%, 38,33% e 65,42%, respectivamente.

Tabela 2. Taxa de maturação citoplasmática (TMC) de oócitos bovinos maturados *in vitro* por diferentes períodos, em meio TCM199 (T0) e TCM199 acrescido de 25% (T25), 50% (T50), 75% (T75) e 100% (T100) de fluido folicular.

Tratamento	Tempo							
	22		24		26		28	
	N	TMC (%)	N	TMC (%)	N	TMC (%)	N	TMC (%)
T0	72	6,94 ^{Ab}	74	52,70 ^{Aa}	75	56,00 ^{Aa}	76	61,84 ^{Aa}
T25	69	7,25 ^{Ac}	70	31,43 ^{Bb}	72	44,44 ^{ABb}	73	68,49 ^{Aa}
T50	73	4,11 ^{Ac}	73	9,59 ^{Cc}	73	31,51 ^{Bb}	75	62,67 ^{Aa}
T75	72	5,56 ^{Ac}	72	11,11 ^{Cc}	75	30,67 ^{Bb}	73	69,86 ^{Aa}
T100	73	2,74 ^{Ad}	69	11,59 ^{Cc}	75	29,33 ^{Bb}	76	64,47 ^{Aa}

Valores seguidos de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem pelo teste χ^2 ($P < 0,05$).

A distribuição dos grânulos corticais no citoplasma do oócito, de acordo com Dode e Graves (2001), sofre influência das células da teca e granulosa durante o processo de maturação, sendo que a perda prematura do acoplamento intercelular do complexo *cumulus*-oócito (COCs) pode causar migração prematura dos grânulos corticais, levando ao envelhecimento precoce do oócito.

Os resultados do presente estudo mostram que o FF além de interferir na progressão meiótica, pode interferir na dinâmica dos GC retardando sua migração para a periferia do oócito (Figura 5) e, dessa forma, promovendo atraso na maturação citoplasmática, proporcionando maior tempo de adesão às células do COCs. Assim, considerando que a cinética de maturação *in vivo* é mais lenta em comparação àquela que ocorre *in vitro*, pode-se admitir que esse atraso na maturação citoplasmática promovida pelo FF seja benéfico aos oócitos.

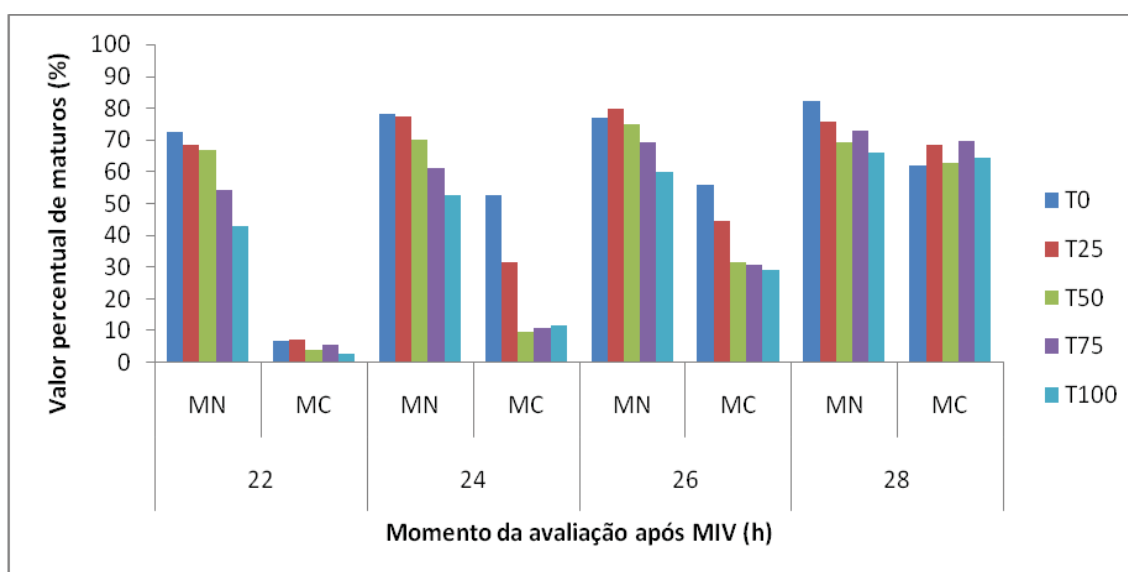


Figura 5. Taxa de maturação nuclear (MN) e citoplasmática (MC) de oócitos bovinos após maturação *in vitro* por 22, 24, 26 e 28 horas em meio TCM199 (T0) e TCM199 acrescido de 25% (T25), 50% (T50), 75% (T75) e 100% (T100) de fluido folicular.

5.2. Experimento 2. Efeito de diferentes momentos de fecundação (24, 26 e 28 h) após maturação de oócitos na presença de Fluido Folicular (FF) sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro* em bovinos.

Neste experimento, foram utilizados 4243 oócitos, distribuídos em 15 grupos experimentais, em seis repetições. Do total de oócitos avaliados, 78,55% clivaram e 22,37% alcançaram o estágio de blastocisto, resultando em uma taxa de blastocistos (blastocistos/oócitos clivados) de 28,47%.

A taxa de clivagem foi influenciada pela proporção de fluido folicular utilizada na MIV, independente do momento da fecundação, sendo que a taxa mais baixa foi obtida com o meio 100% de FF e a mais elevada com o meio TCM199 (Tabela 3). As taxas obtidas com os meios contendo 25% e 50% de FF foram similares às aquelas verificadas para o meio TCM199 nos três momentos de fecundação (24, 26 e 28 h). Os meios contendo 75% e 100% de FF apresentaram as menores taxas de clivagem ($P < 0,05$).

Tabela 3. Taxa de clivagem de embriões bovinos fecundados 24, 26 ou 28 horas após maturação *in vitro* em meio TCM199 (T0) e TCM199 acrescido de 25% (T25), 50% (T50), 75% (T75) e 100% (T100) de fluido folicular.

Tratamento	Taxa de clivagem (%)					
	n	24 h*	n	26 h*	N	28 h*
T0	375	90,13 ^{Aa}	379	90,77 ^{Aa}	187	55,61 ^{Ab}
T25	384	89,32 ^{Aa}	395	90,63 ^{Aa}	191	53,40 ^{Ab}
T50	408	87,75 ^{Ab}	401	88,28 ^{Aa}	189	49,74 ^{Ab}
T75	243	81,89 ^{Ca}	241	81,74 ^{Ba}	186	43,01 ^{Bb}
T100	242	82,64 ^{BCa}	239	80,75 ^{Ba}	183	37,70 ^{Bb}

* Momento da FIV

Valores seguidos de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem pelo teste χ^2 ($P < 0,05$).

Contrariamente aos resultados do presente estudo, Avery *et al.* (2003) obtiveram taxas de clivagem insatisfatórias (em torno de 9%) ao utilizarem FF puro. Esses autores atribuíram as baixas taxas de clivagem à capacidade do FF em provocar adesão de substâncias sólidas às células do *cumulus*, formando uma barreira mecânica que dificulta a penetração dos espermatozoides. Esses achados sugerem que o FF em altas concentrações pode influenciar negativamente por meio da adesão

dessas substâncias às células do COCs. No entanto, neste estudo foi utilizado heparina com posterior filtragem do FF durante o preparo do mesmo, com o intuito de aumentar o tempo de adesão entre as células do COCs, retardando a meiose, mas sem acúmulo de substâncias sólidas, permitindo que a fecundação ocorra de forma adequada. Isso provavelmente explica os valores superiores obtidos neste trabalho em comparação aos relatados previamente.

O momento da fecundação influenciou a taxa de clivagem, independente do meio de maturação utilizado ($P < 0,05$), sendo que os embriões fecundados após 24 e 26 h de maturação apresentaram taxas de clivagem média (87,05% e 87,37%, respectivamente) superiores àqueles fecundados no tempo de 28 horas (47,97%).

As baixas taxas de clivagem obtidas no tempo de 28 horas de maturação podem ser justificadas pelo fato da fecundação não ocorrer imediatamente após a inseminação. De acordo com Méo Niciura (2005), os pronúcleos aparecem pela primeira vez após 12h da inseminação dos oócitos, assim, os oócitos inseminados mais tardiamente (28 h), teriam perdido o momento ótimo para a fecundação devido ao envelhecimento oocitário.

De acordo com Fissore *et al.* (2002) e Dulcibella *et al.* (1990), durante o processo de envelhecimento ocorre deterioração progressiva do oócito com rompimento das membranas mitocondriais e incapacidade de gerar adenosina trifosfato, diminuição significativa do número e liberação de conteúdo dos CG, comprometendo a proliferação e a sobrevivência da célula. É importante ressaltar que os oócitos submetidos à maturação *in vitro* apresentam maior demanda de energia, fazendo com que as lesões causadas pelo envelhecimento oocitário se tornem mais expressivas (PRENTICE *et al.*, 2011).

A adição de FF adicionado ao meio de MIV influenciou na taxa de blastocistos independente do momento da fecundação (24, 26 ou 28h), sendo que a taxa mais baixa foi obtida com 100% de FF e a mais elevada com o meio TCM199 + 25%FF (Tabela 4).

A taxa de blastocisto obtida com o meio TCM199 + 25%FF foi semelhante àquela verificada para o meio TCM199, quando os oócitos foram fecundados com 24, 26 ou 28 h de MIV. No entanto, na medida em que foi aumentada a proporção de FF ao

meio (50%, 75% ou 100%), independente do momento de fecundação (24, 26 ou 28 h) houve redução progressiva da taxa de blastocisto ($P < 0,05$) (Tabela 4).

O meio TCM199 + 25%FF mostrou-se eficiente para promover a MIV independente do tempo de maturação (24, 26 ou 28 h), proporcionando taxas de blastocisto elevadas. Essas taxas satisfatórias e numericamente superiores podem ser resultantes da capacidade do FF promover o retardo da progressão dos GC, o qual na proporção de 25% proporciona ambiente adequado para o desenvolvimento embrionário.

Tabela 4. Taxa de blastocistos bovinos fecundados 24, 26 ou 28 horas após maturação *in vitro* em meio TCM199 (T0) e TCM199 acrescido de 25% (T25), 50% (T50), 75% (T75) e 100% (T100) de fluido folicular.

Tratamento	Taxa de blastocisto (%)					
	n	24 h*	N	26 h*	n	28 h*
T0	375	35,73 ^{Aa}	379	33,77 ^{Aa}	187	12,83 ^{Ab}
T25	384	41,41 ^{Aa}	395	38,73 ^{Aa}	191	14,14 ^{Ab}
T50	408	17,65 ^{Ba}	401	18,45 ^{Ba}	189	8,47 ^{Ab}
T75	243	16,46 ^{Bca}	241	17,01 ^{Ba}	186	7,53 ^{Ab}
T100	242	11,57 ^{Ca}	239	13,39 ^{Ba}	183	3,83 ^{Ab}

* Momento da FIV

Valores seguidos de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem pelo teste χ^2 ($P < 0,05$).

Considerando que no ambiente *in vivo*, as modificações do ambiente folicular ocorrem de maneira gradual, as baixas taxas de blastocisto obtidas com o uso de proporções $\geq 50\%$ de FF podem ser justificadas pela mudança brusca de meios no ambiente *in vitro*, o que, provavelmente, resulta em alterações das vias metabólicas do oócito, interferindo negativamente durante a maturação. Esses resultados estão de acordo com os achados de Elmileik *et al.* (1995) e Kim *et al.* (1996), os quais salientam que o FF em proporções de 50 e 60% tem efeito negativo sobre o desenvolvimento embrionário.

O momento de fecundação, por sua vez, também influenciou a taxa de blastocisto, independente do meio de maturação utilizado. As taxas de blastocisto médias (26,21% e 25,86%), para os momentos de fecundação 24 e 26 horas foram superiores a taxa média (9,40%) obtida no momento de 28 horas ($P > 0,05$).

Semelhante ao que ocorreu com a taxa de clivagem, as baixas taxas de blastocistos verificadas quando a fecundação foi realizada com 28 horas de MIV (Figura 6) foram, provavelmente, em consequência do envelhecimento oocitário.

O envelhecimento oocitário pode ser resultado de danos anteriores à fecundação. Cummins (2004) relata que os danos mitocondriais promovem colapso do potencial transmembrana da organela, que em efeito cascata provoca separação da cadeia respiratória, superprodução e liberação de ânions superóxidos, interrupção da biogênese mitocondrial, efusão de glutathione e cálcio da matriz e, por fim, a liberação de proteínas transmembrana solúveis que levarão à ativação das caspases. Secundariamente ocorre ativação das endonucleases e fragmentação do DNA, podendo assim impossibilitar a fecundação e/ou clivagem.

Segundo Souza *et al.* (2009), oócitos envelhecidos, ainda que consigam ser fecundados e iniciem o desenvolvimento embrionário, podem não alcançar a fase de blastocisto, devido a erros no momento da fertilização. Durante a penetração do espermatozoide no oócito envelhecido pode ocorrer uma sinalização do influxo de íons cálcio, que atua como indutor de apoptose, interrompendo assim o desenvolvimento.

Os resultados do presente estudo corroboram com a teoria de envelhecimento oocitário, uma vez que, independente da proporção de FF utilizada, quando a fecundação ocorreu mais tardiamente (no momento de 28 horas) as taxas de blastocisto foram insatisfatórias.

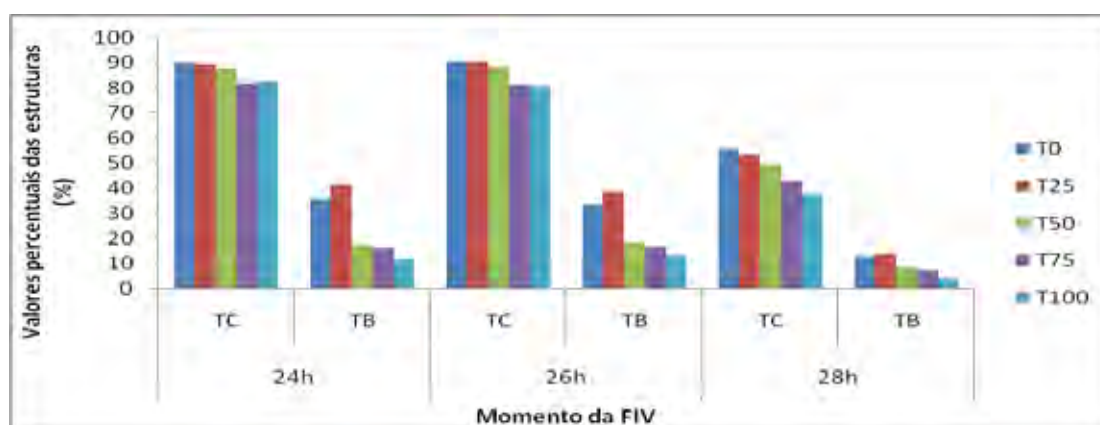


Figura 6. Taxa de clivagem e taxa de blastocistos de oócitos fecundados com 24, 26 e 28 horas de maturação *in vitro* em meio TCM199 (T0) e TCM199 acrescido de 25% (T25), 50% (T50), 75% (T75) e 100% (T100) de fluido folicular.

Para se determinar o efeito da adição do FF durante a MIV e fecundação em diferentes momentos (24 e 26h de MIV) sobre a qualidade embrionária, foram utilizados 360 embriões, distribuídos em seis grupos experimentais com três repetições. Para essa etapa, foram selecionados os melhores momentos de fecundação (24 e 26h) e melhores meios (TCM199, TCM199 + 25%FF e TCM199 + 50%FF) definidos previamente.

No desenvolvimento inicial, o embrião é composto por dois tipos de células: células da massa celular interna (MCI), e células do trofoblasto (TF), sendo que as células da MCI originarão o feto, enquanto que as células do TF originarão as membranas extra-embriônicas (revisado por DÍAZ-CUETO e GERTON, 2001).

Considerando que a morfologia do embrião não se constitui isoladamente em um fator que permite determinar a viabilidade embrionária, a quantificação das células da MCI e do TF vem sendo utilizada como método adicional indicativo de qualidade dos embriões produzidos *in vitro* (Figura 7).

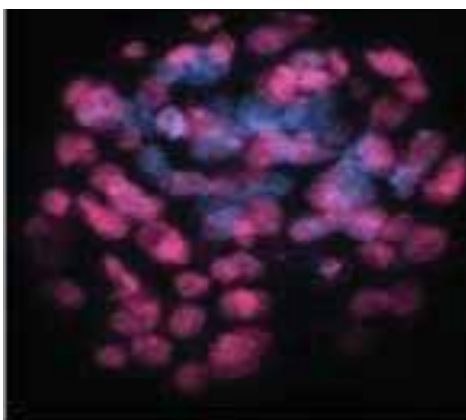


Figura 7. Fotomicrografias de blastocisto (sete dias após a FIV) avaliada pela técnica de coloração diferencial sob microscopia de epifluorescência. Núcleos das células da massa celular interna (azul, Hoechst 33342) e núcleos das células do trofoblasto (rosa, iodeto de propídeo + Hoechst).

Os meios TCM199 e TCM199 + 25%FF proporcionaram número de células da MCI semelhantes nos dois momentos de fecundação avaliados (24 e 26 horas). A quantidade de células da MCI ainda foi semelhante para os três meios de cultivo quando a fecundação foi realizada no momento de 26 horas. Entretanto, os meios de TCM199 + 25%FF e TCM199 proporcionaram menor número de células da MCI

($P < 0,05$) que o meio TCM199 + 50%FF quando a fecundação foi realizada às 24 horas de maturação (Tabela 5).

A adição de fluido folicular ao meio TCM199 não influenciou o número de células do TF ($P > 0,05$). O número de células do TF foi influenciado pelo momento da fecundação apenas no meio TCM199 + 50%FF (Tabela 5). O número médio de células da TF após fecundação realizada com 24 horas de maturação foi de $69,47 \pm 5,41$, e às 26 horas, $77,01 \pm 4,58$.

O número total de células (MCI+TF) sofreu influência da adição de fluido folicular ao meio TCM199 ($P < 0,05$) quando a fecundação foi realizada com 26 h, sendo que o meio TCM199 + 50%FF foi superior ao meio TCM199 (Tabela 5).

Os embriões fecundados com 26 h de maturação apresentaram maior número de células que aqueles fecundados com 24 h de maturação, sendo que o número médio de células totais foi de $100,90 \pm 7,59$ e $114,07 \pm 7,39$ para 24 e 26 h de maturação, respectivamente ($P < 0,05$).

Tabela 5. Número de células da MCI, TF e número de células totais em embriões bovinos fecundados 24 ou 26 horas após maturação e cultivados *in vitro* por sete dias em meio TCM199 (T0) e TCM199 acrescido de 25% (T25), 50% (T50) de fluido folicular.

Trat	Número de células					
	MCI		TF		MCI + TF	
	24 h*	26 h*	24 h*	26 h*	24 h*	26 h*
T0	$29,91 \pm 3,83^{Ba}$	$34,84 \pm 3,78^{Aa}$	$67,93 \pm 3,78^{Aa}$	$74,69 \pm 2,02^{Aa}$	$97,84 \pm 5,70^{Ab}$	$109,53 \pm 4,24^{Ba}$
T25	$28,87 \pm 0,83^{Bb}$	$36,29 \pm 1,46^{Aa}$	$67,98 \pm 3,91^{Aa}$	$75,73 \pm 3,32^{Aa}$	$96,84 \pm 4,85^{Ab}$	$112,02 \pm 3,98^{ABa}$
T50	$35,49 \pm 1,46^{Aa}$	$40,04 \pm 2,80^{Aa}$	$72,51 \pm 3,32^{Ab}$	$80,62 \pm 5,87^{Aa}$	$108,00 \pm 3,98^{Ab}$	$120,67 \pm 7,96^{Aa}$

* Momento da FIV

Valores seguidos de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem pelo teste Tukey (ANOVA, $P < 0,05$).

De acordo com Kuran *et al.* (2001), blastocistos produzidos em meio rico em proteínas possuem maior número de células que aqueles produzidos em meio deficiente em proteínas. O fluido folicular é uma solução ligeiramente viscosa, rica em proteínas e constituída por grande variedade de componentes bioquímicos essenciais para a maturação final dos oócitos (FAHIMINIYA e GERARD, 2010).

No presente estudo, foi verificado que embora o FF acrescido ao meio TCM199 na proporção de 50% tenha levado a uma menor taxa de blastocistos, proporcionou a obtenção de embriões com maior número de células totais, portanto, de melhor qualidade.

Embora Fleming (1987) admita que a proporção exata não esteja devidamente estabelecida, Avelino (2004) sugere a proporção 1:2 como a mais adequada. Assim, nesse experimento foram considerados como embriões superiores aqueles que apresentaram uma razão entre MCI e TF $\geq 1:2$.

O percentual de embriões superiores foi influenciado pela adição de fluido folicular ao meio TCM199 ($P < 0,05$) de forma negativa na proporção de 50% quando a fecundação foi realizada com 24 horas, porém, sem diferença significativa em comparação aos demais grupos quando a fecundação ocorreu mais tardiamente (26 h). No momento de fecundação de 24 horas, o meio TCM199 + 25% FF foi superior ($P < 0,05$) ao meio de maturação TCM199 + 50% FF (Tabela 6).

Tabela 6. Percentual de embriões bovinos superiores fecundados 24 ou 26 horas após maturação e cultivados *in vitro* por sete dias em meio TCM199 (T0) e TCM199 acrescido de 25% (T25) ou 50% (T50) de fluido folicular.

Tratamento	Número relativo de embriões superiores (%)	
	24 h*	26 h*
T0	68,89 ^{Aa}	55,55 ^{Aa}
T25	73,33 ^{Aa}	62,22 ^{Aa}
T50	51,11 ^{Ba}	60,00 ^{Aa}

* Momento da FIV

Valores seguidos de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem pelo teste χ^2 ($P < 0,05$).

Baseando-se nas médias gerais aproximadas do número de células da MCI (34), do TF (73) e totais - T (107), os blastocistos obtidos a partir de oócitos fecundados nos diferentes momentos (24 e 26 horas) foram classificados em embriões de qualidade superior ou inferior (Tabela 7). As médias utilizadas foram obtidas a partir dos dados deste trabalho, servindo apenas para avaliar os resultados deste experimento.

Tabela 7. Frequência (%) média de embriões superiores (MCI>34; TF>73; T>107) produzidos com oócitos fecundados 24 ou 26 horas após maturação e cultivados *in vitro* por sete dias em meio TCM199 (T0) e TCM199 acrescido de 25% (T25) ou 50% (T50) de fluido folicular.

Trat.	Frequência (%) de embriões superiores					
	MCI > 34		TF > 73		Totais > 107	
	24	26	24	26	24	26
T0	22,22 ^{Ba} (10/45)	44,44 ^{Bb} (20/45)	42,22 ^{Ab} (19/45)	53,33 ^{Bb} (24/45)	46,67 ^{Aa} (21/45)	64,44 ^{Bb} (29/45)
T25	44,44 ^{Aa} (20/45)	44,44 ^{Ba} (20/45)	46,67 ^{Aa} (21/45)	55,56 ^{Bb} (25/45)	53,33 ^{Aa} (24/45)	55,56 ^{Ca} (25/45)
T50	22,22 ^{Ba} (10/45)	57,78 ^{Ab} (26/45)	40,00 ^{Ba} (18/45)	64,44 ^{Ab} (29/45)	31,11 ^{Ba} (17/45)	80,00 ^{Ab} (36/45)
TOTAL	39,25(106/270)		50,37(136/270)		55,18(149/270)	

Valores seguidos de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem pelo teste χ^2 ($P < 0,05$).

Algriany *et al.* (2004) relataram que a suplementação do meio de maturação com fluido folicular resulta em uma melhoria da capacidade de desenvolvimento de oócitos bovinos e conseqüentemente do desenvolvimento embrionário, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo, no qual a adição de FF ao meio de maturação se mostrou benéfica.

5.3. Experimento 3. Efeito da adição da proteína recombinante humana GDF9 associado ao fluido folicular nos meios de maturação sobre a taxa de clivagem, desenvolvimento e qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

No presente experimento foram utilizados 1967 oócitos, distribuídos em oito grupos experimentais com cinco repetições. Do total de oócitos avaliados, 90,90% clivaram e 42,50% alcançaram o estágio de blastocisto, resultando em uma taxa média de blastocistos (blastocistos/oócitos clivados) de 46,76%.

A suplementação do meio com a proteína recombinante humana GDF9, não influenciou nas taxas de clivagem e de blastocistos, independente da adição de 25% de FF associado ao meio de TCM199. As taxas médias de clivagem foram de 92,06% e 89,75% no meio TCM199 e no meio TCM199 + 25%FF suplementados com GDF9, respectivamente, enquanto as taxas de blastocisto para os respectivos meios foram de 42,67% e 42,34% (Tabela 8).

Tabela 8. Taxa de clivagem (TC) e taxa de blastocistos (TB) bovinos fecundados 24 horas após maturação *in vitro* em meio TCM199 (T0) e TCM199 suplementado com 25 ng (T25), 100 ng (T100) e 200 ng (T200) da proteína recombinante humana GDF9, com ou sem 25% de fluido folicular.

Tratamento	TCM199			TCM199 + 25% de FF		
	N	TC (%)	TB (%)	n	TC (%)	TB (%)
T0	245	93,06	42,86	247	91,90	42,91
T25	249	91,97	41,37	243	89,30	43,62
T100	249	92,37	43,78	241	88,80	42,74
T200	239	90,79	42,68	254	88,98	40,16

Valores não diferem pelo teste χ^2 ($P < 0,05$).

Estudos anteriores (HREINSSON *et al.*, 2002; YEO *et al.*, 2008; MOTTTERSHEAD e WATSON, 2009) sugerem que a adição da proteína recombinante humana GDF9 ao meio de maturação melhora a expansão das células do *cumulus*, maturação do oócito e desenvolvimento da competência oocitária.

Diferentemente dos resultados do presente estudo, diversos trabalhos têm mostrado que a suplementação com GDF9 além de promover a expansão dos COCs, facilitando a fertilização, proporciona a obtenção de maior número de blastocistos, e

ainda dá suporte ao desenvolvimento e viabilidade embrionária (revisado por OTSUKA *et al.*, 2011). Os resultados desse estudo, corroboram com os achados de Jee *et al.* (2011) que não encontraram relação entre a adição da proteína recombinante humana GDF9 e as taxas de blastocisto.

Pagas e Matzuk (2005) ressaltam que a forma de preparo do GDF9 pode interferir no modo de sinalização da proteína no oócito, e posteriormente no desenvolvimento embrionário. Na maioria dos estudos desenvolvidos, o GDF9 foi produzido de forma latente a partir de células 293T (GILCHRIST *et al.*, 2004; HUSSEIN *et al.*, 2005), resultando assim em um meio semi-definido, não sendo de pleno conhecimento o conteúdo e concentrações dos componentes presentes no extrato obtido. No presente estudo foi utilizado um produto definido e disponível comercialmente, a proteína GDF9 recombinante humana (GDF9 human®, Sigma-Aldrich), obtido a partir de *E. coli*. Porém, ainda não há disponibilidade dessa proteína de origem bovina. Esse fator provavelmente foi preponderante para os resultados obtidos.

Outro aspecto relevante consiste no fato de que o GDF9 age associado ao fator de crescimento BMP15 (COLEMAN *et al.*, 2007), muitas vezes por meio da formação de heterodímeros (revisado por LIMA *et al.*, 2010). Em um estudo utilizando células da granulosa, McNatty *et al.*, (2005) demonstraram que a ação desses fatores é diferente quando agem associados ou isolados.

Para determinar o efeito da adição da proteína recombinante humana GDF9 associada ao fluido folicular nos meios de maturação sobre a qualidade embrionária (baseando-se no número de células da massa celular interna - MCI, do trofoblasto - TF e totais) foram utilizados 360 embriões, distribuídos em oito grupos experimentais com três repetições.

A quantidade de GDF9 adicionado aos meios de cultivo TCM199 ou TCM199 + 25%FF influenciou o número de células da MCI ($P < 0,05$), sendo que o menor número de células foi obtido com o meio TCM199 + 25%FF suplementado com 25 ng/mL de GDF9 e o maior com o meio TCM199 + 25%FF suplementado com 200 ng/mL de GDF9. No entanto, independente do nível de suplementação com GDF9, o número de células da MCI não foi influenciado pela adição do FF ao meio TCM199, cujas médias

(\pm EP) de número de células da MCI foram $31,09 \pm 2,58$ e $31,95 \pm 2,77$ para os meios TCM199 e TCM199 + 25%FF, respectivamente (Tabela 9).

De maneira semelhante ao que ocorreu com as células da MCI, a quantidade de GDF9 adicionado aos meios de cultivo influenciou o número de células da TF ($P < 0,05$). O número mais baixo foi obtido com o meio TCM199 + 25%FF suplementado com 200 ng/mL de GDF9 e o mais elevado com o meio TCM199 suplementado com 25 ng/mL de GDF9. Também, independente da quantidade de GDF9 suplementada, o número de células do TF não foi influenciado pela adição do FF ao meio TCM199, haja vista que as médias (\pm EP) de número de células da TF foram $64,72 \pm 3,21$ no meio TCM199 e $64,02 \pm 2,77$ no meio TCM199 + 25%FF (Tabela 9).

Em relação ao número total de células (MCI+TF), a exceção do meio TCM199 + 25%FF suplementado com 25 ng/mL de GDF9 que apresentou menor número de células ($P < 0,05$), não houve diferença entre os demais meios (Tabela 9).

Tabela 9. Número de células da MCI, TF e totais em embriões bovinos fecundados 24 horas após maturação *in vitro* em meio TCM199 (T0) e TCM199 suplementado com 25 ng (T25), 100 ng (T100) e 200 ng (T200) da proteína recombinante humana GDF9, com ou sem 25% de fluido folicular.

Trat.	Número de células					
	MCI		TF		Totais	
	TCM199	TCM199+25%FF	TCM199	TCM199+25%FF	TCM199	TCM199+25%FF
T0	$32,27 \pm 2,43^{ABa}$	$33,09 \pm 3,52^{ABa}$	$68,02 \pm 3,51^{Aa}$	$70,13 \pm 3,38^{Aa}$	$100,29 \pm 5,79^{Aa}$	$103,22 \pm 4,66^{Aa}$
T25	$28,60 \pm 1,58^{Ba}$	$24,71 \pm 1,81^{Ca}$	$70,87 \pm 4,45^{Aa}$	$66,02 \pm 5,83^{ABa}$	$99,47 \pm 7,37^{Aa}$	$90,73 \pm 6,64^{Ba}$
T100	$29,11 \pm 1,90^{ABa}$	$31,31 \pm 2,38^{Ba}$	$65,71 \pm 2,03^{ABa}$	$68,09 \pm 2,81^{Aa}$	$94,82 \pm 4,50^{Aa}$	$99,40 \pm 4,86^{ABa}$
T200	$36,38 \pm 1,61^{Aa}$	$37,87 \pm 0,97^{Aa}$	$54,27 \pm 3,24^{Ba}$	$55,84 \pm 4,31^{Ba}$	$90,64 \pm 5,88^{Aa}$	$93,71 \pm 3,67^{Aba}$

Valores seguidos de letras diferentes, maiúsculas, em uma mesma coluna, e minúsculas, em uma mesma linha, diferem pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

De acordo com Su *et al.* (2008) e Jee *et al.* (2011) o GDF9 está envolvido nas interconexões entre oócitos e as células do *cumulus* adjacentes, bem como regula a biossíntese de colesterol e a absorção de aminoácidos e glicose das células do *cumulus*. Embora as principais modificações no embrião ocorram durante o desenvolvimento embrionário (PERECIN *et al.*, 2009), a qualidade do oócito é fundamental para o desenvolvimento do embrião (SIRARD *et al.*, 2006, ANGUITA *et al.*, 2007).

A quantidade de GDF9 suplementada ao meio de cultivo TCM199, em presença ou não de FF (25%), interferiu sobre o percentual de embriões considerados superiores (Tabela 10). Enquanto que a suplementação com 25 e 100 ng influenciou negativamente, os meios TCM199 e TCM199 + 25%FF suplementados com 200 ng/mL de GDF9 promoveram maior percentual de embriões superiores ($P < 0,05$).

O percentual elevado de embriões superiores obtido com o uso do meio TCM199 suplementado com 200 ng/mL de GDF9 encontrado no presente estudo, corrobora com os achados de Yeo *et al.*, (2008), os quais sustentam que o GDF9 promove maturação oocitária adequada e melhora a qualidade e a viabilidade do embrião utilizando 200 ng/mL de GDF9. Provavelmente essa melhoria está relacionada com a capacidade do GDF9 em regular a absorção de aminoácidos, glicólise e biossíntese de colesterol das células *cumulus* via junções ao oócito (SU *et al.*, 2008; JEE *et al.*, 2011).

Tabela 10. Percentual de embriões bovinos superiores fecundados 24 horas após maturação *in vitro* em meio TCM199 (T0) e TCM199 suplementado com 25 ng (T25), 100 ng (T100) e 200 ng (T200) da proteína recombinante humana GDF9, com ou sem 25% de fluido folicular.

Tratamento	Número relativo de embriões superiores (%)	
	TCM199	TCM199 + 25%FF
T0	66,66 ^{Ba}	71,11 ^{Ba}
T25	37,77 ^{Ca}	44,44 ^{Ca}
T100	44,44 ^{Ca}	57,77 ^{Ca}
T200	88,22 ^{Aa}	80,00 ^{Aa}

Valores seguidos de letras diferentes, maiúsculas, na coluna, e minúsculas, na linha, diferem pelo teste χ^2 ($P < 0,05$).

Baseando-se nas médias gerais aproximadas do número de células da MCI (31), do TF (64) e do T (96), os blastocistos foram classificados em embriões de qualidade superior ou inferior (Tabela 11). As médias utilizadas foram obtidas dos dados deste trabalho, servindo apenas para avaliar os resultados deste experimento.

Tabela 11. Frequência (%) média de embriões superiores (MCI>31; TF>64; T>96) produzidos com oócitos fecundados 24 horas após maturação *in vitro* em meio TCM199 (T0) e TCM199 suplementado com 25 ng (T25), 100 ng (T100) e 200 ng (T200) da proteína recombinante humana GDF9, com ou sem 25% de fluido folicular.

Trat.	Frequência (%) de embriões superiores					
	MCI > 31		TF > 64		Totais > 96	
	TCM199	TCM199+25%FF	TCM199	TCM199+25%FF	TCM199	TCM199+25%FF
T0	33,33 ^{Ba} (15/45)	40,00 ^{Ba} (18/45)	53,33 ^{Aa} (24/45)	62,22 ^{Aa} (28/45)	48,89 ^{Aa} (22/45)	51,11 ^{Aa} (23/45)
T25	22,22 ^{Ca} (10/45)	13,33 ^{Ca} (6/45)	60,00 ^{Aa} (27/45)	51,11 ^{Aa} (23/45)	44,44 ^{Aa} (20/45)	37,78 ^{Aba} (17/45)
T100	28,89 ^{Ba} (13/45)	46,67 ^{Ba} (21/45)	55,56 ^{Aa} (25/45)	53,33 ^{Aa} (24/45)	42,22 ^{Aa} (19/45)	48,89 ^{Aa} (22/45)
T200	55,56 ^{Aa} (25/45)	71,11 ^{Aa} (32/45)	22,22 ^{Ba} (10/45)	26,67 ^{Ba} (12/45)	20,00 ^{Ba} (9/45)	31,11 ^{Ba} (14/45)
TOTAL	38,89(140/360)		48,06(173/360)		40,56(146/360)	

Valores seguidos de letras diferentes, maiúsculas, na coluna, e minúsculas, na linha, diferem pelo teste χ^2 (P<0,05).

Gode *et al.* (2011) afirmam que o aumento do nível de GDF9 no FF melhora a maturação nuclear dos oócitos e a qualidade dos embriões. No presente estudo foi possível verificar que a quantidade 200 ng/mL de GDF9 suplementada ao meio TCM199, com ou sem FF (25%) reduziu a frequência de embriões com maior número de células do TF e aumentou a proporção de embriões com maior número de células da MCI, contribuindo positivamente na relação entre MCI e TF. No entanto esse grupo apresenta a menor (p<0,05) frequência de embriões com células totais maiores que a média calculada para o experimento.

6. CONCLUSÕES

A concentração de 25% de fluido folicular não melhorou as taxas de maturação, clivagem, desenvolvimento e qualidade dos embriões em comparação a ausência do fluido folicular em diferentes momentos de MIV.

A concentração de 50% de fluido folicular retarda a maturação citoplasmática, promove redução progressiva das taxas de desenvolvimento embrionário, no entanto, quando a FIV foi realizada no momento de 26 horas, houve um aumento significativo do número total de células nos embriões produzidos.

A suplementação do meio com a quantidade 200 ng/mL de GDF9 suplementada ao meio TCM199, com ou sem FF (25%) reduziu a frequência de embriões com maior número de células do TF e aumentou a proporção de embriões com maior número de células da MCI, contribuindo positivamente na relação entre MCI e TF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADONA, P.R; PIRES, P.R.L.; QUETGLAS, M.D.; SCHWARZ, K.R.L.; LEAL, C.L.V. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Reproduction Science**, v. 108 (1-2), p. 49-65, 2008.

AGUILAR, J., WOODS, G., MIRAGAYA, M., OLSEN, L., VANDERWALL, D. Effect of homologous preovulatory follicular fluid on *in vitro* maturation of equine *cumulus*-oocyte complexes. **Theriogenology**, v. 56 p. 745-758–899, 2001.

AGUNG, B., PIAO, I, FUCHIMOTO, D., SENBON, S., ONISHI, A., OTOI, T., NAGAI, T. Effects of oxygen tension and follicle cells on maturation and fertilization of porcine oocytes during *in vitro* culture in follicular fluid. **Theriogenology**, v. 73 p. 893–899, 2010.

ALGRIANY, O., BEVERS, M., SCHOEVERS, E., COLENBRANDER, B., DIELEMAN, S. Follicle size-dependent effects of sow follicular fluid on *in vitro cumulus* expansion, nuclear maturation and blastocyst formation of sow *cumulus* oocytes complexes. **Theriogenology**, v. 62, p. 1483–1497, 2004.

ALI, A., COENEN, K., BOUSQUET, D., SIRARD, M.A. Origin of bovine follicular fluid and its effect during *in vitro* maturation on the developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 62, p. 1596–1606, 2004.

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.

ARIAS-ALVAREZ M, BERMEJO-ALVAREZ P, GUTIERREZ-ADAN A, RIZOS D, LORENZO PL, LONERGAN P. Effect of leptin supplementation during *in vitro* oocyte maturation and embryo culture on bovine embryo development and gene expression patterns. **Theriogenology**. v. 75, n. 5, p. 887-896, 2011.

ASSUMPÇÃO, M. E.; HAIPECK, O. D.; LIMA, K. A. Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.3, p.149-156, 2002.

AVELINO, K. B. **Estimulação e inibição da síntese de glutatona em oócitos bovinos: efeitos sobre a maturação e desenvolvimento embrionário *in vitro***. 2004. 92 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal) –Universidade Estadual Paulista - Jaboticabal, 2004.

AVERY, B., STROBECH, L., JACOBSEN, T., BOGH, I., GREVE, T. *In vitro* maturation of bovine *cumulus*-oocyte complexes in undiluted follicular fluido effect on nuclear maturation, pronucleus formation and embryo development. **Theriogenology**, v. 59, p. 987-999, 2003.

BEKER, A., COLEBRANDER, B., BEVERS, M. Effect of 17 β -estradiol on the *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 58, p. 1663-1673, 2002.

BEVERS, M. M., DIELEMAN, S. J., van der HURK, R., *et al.* Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v. 47, p. 13-22, 1997.

BEVERS, M., IZADYAR, F. Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, p. 173-178, 2002.

BIJTTCIER, j. VAN SOON, A., MEYER, E., MATEUSEN, B., MAES, D. Preovulatory follicular fluid during *in vitro* maturation decreases polyspermic fertilization of *cumulus*-intact porcine oocytes *In vitro* maturation of porcine oocytes **Theriogenology**, v. 70, p. 715–724, 2008.

BIJTTEBIER, J., VAN SOOM, A., MEYER, E., MATEUSEN, B., MAES, D. Preovulatory follicular fluid during *in vitro* maturation decreases polyspermic fertilization of *cumulus*-intact porcine oocytes *in vitro* maturation of porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 70, p. 715–724, 2008.

BØGH IB, BÉZARD J, DUCHAMP G, BALTSSEN M, GÉRARD N, DAELS P, GREVE T. Pure preovulatory follicular fluid promotes *in vitro* maturation of *in vivo* aspirated equine oocytes. **Theriogenology**. v. 57, n. 7, p. 1765-1779, 2002.

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

BREVINI, T., CILLO, F., ANTONINI, S., GANDOLFI, F. Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 23–38, 2007.

CAILLAUD M, DELL'AQUILA ME, DE SANTIS T, NICASSIO M, LACALANDRA GM, GOUDET G, GERARD N. *In vitro* equine oocyte maturation in pure follicular fluid plus interleukin-1 and fertilization following ICSI. **Animal Reproduction Science**, v. 106, p. 431-439, 2008.

CAN, A.; SEMIZ, O.; CINAR, O. Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in mouse oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v.9, p.749-756, 2003.

CARNEIRO, G. F.; LIU, I. K. M.; HYRE, D.; ANDERSON, G. B.; LORENZO, P. L.; BALL, B. A. Quantification and distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, p. 451-58, 2002.

CASTRO E PAULA, L. A., HANSEN, P. J. Interactions between oxygen tension and glucose concentration that modulate actions of heat shock on bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v. 68, p. 763-770, 2007.

CHAUHAN MS, PALTA P, DAS SK, KATIYAR PK, MADAN ML. Replacement of serum and hormone additives with follicular fluid in the IVM medium: effects on maturation, fertilization and subsequent development of buffalo oocytes *in vitro*. **Theriogenology**. v. 48, n. 3, p. 461-469, 1997

CHERR, G. N.; DROBNIS, E. Z.; KATZ, D. F. Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 246, p. 81-93, 1988.

CHOI, Y.H. TAKAGI, M. KAMISHITA H. Developmental capacity of bovine oocytes matured in two kinds of follicular fluid and fertilized *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 50, p. 27-33, 1998.

COELHO, L., ESPER, C., GARCIA, J., VANTINI, R., ALMEIDA JÚNIOR, I. Fecundação *in vitro* de ovócitos bovinos com sêmen submetido a diferentes diluidores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 397-402, 2000.

COLEMAN, N., SHAGIAKMETOVA, G., LEBEDEVA, I., KUZMINA, T., GOLUBEY, A. *In vitro* maturation and early developmental capacity of bovine oocytes cultured in pure follicular fluid and supplementation with follicular wall. **Theriogenology**, v. 67, p. 1053-1059, 2007.

CUMMINS, J. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology** v. 115, p. 23–29. 2004.

DAMIANI, P.; FISSORE, R. A.; CILELLI, J. B.; LONG, C. R.; BALISE, J. J.; ROBL, J. M.; DUBY, R. T. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 521-534, 1996.

DANIELS, R. ,HALL, V., TROUNSON, A. O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1034–1040, 2000.

DE LOS REYES, M., PALOMINO, J., PARRAGUEZ, V., HIDALGO, M., SAFFIE, P. Mitochondrial distribution and meiotic progression in canine oocytes during *in vivo* and *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v. 75, p. 346–353, 2011.

DELL'AQUILA, M., CHO, Y., MINOIA, P., TRAINA, T., LACALANDRA, G., MARITATO, F. Effects of follicular fluid supplementation of in-vitro maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v. 12, p. 2266-2272, 1997.

DODE, M., GRAVES, C. Influence of hormones and follicular fluid on maturation of pig oocytes. **Ciência Rural**, v.31, n.1, p.99-104, 2001

DULCIBELLA, 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.

DUPRÉ, A., HACCARD, O., JESSUS, C. MOS in the oocyte: how to use MAPK independently of growth factors and transcription to control meiotic divisions. **Journal of Signal Transduction**. v 2011, 15p.

DURANTHON, V., WATSON, A. J., LONERGAN, P. Preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment. **Reproduction**, v. 135, p. 141-150, 2008.

ELIS, S., J DUPONT, I COUTY, L PERSANI¹, M GOVOROUN, E BLESBOIS, F BATELLIER AND P MONGET. Expression and biological effects of bone morphogenetic protein-15 in the hen ovary. **Journal of Endocrinology**, v. 194, p. 485–497, 2007

ELMILEIK, A., MAEDA, T. TERADA, T. Higher rates of development into blastocyst following the *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured in a medium supplemented with the fluid from large bovine follicles. **Animal Reproduction Science** v.38, p. 85-96, 1995.

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

FAHIMINIYA, S., GERARD, N. Le liquide folliculaire chez les mammifères. **Gynécologie Obstétrique e Fertilité**, v. 38, p. 402–404, 2010.

FAIR T, HYTTEL P, GREVE T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, p. 437–442, 1995.

FAIR, T., HYTTEL, P., LONERGAN, P., BOLANDO, M. Immunolocalization of nucleolar proteins during bovine oocyte growth, meiotic maturation and fertilization. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1516-1525, 2001.

FARIN, P. W., CROSIER, A. E., FARIN, C. E. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v. 55, p. 151-170, 2001.

FATEHI, A., VAN DEN HURK, R., COLENBRANDER, B., DAEMEN, A., VAN TOL, H., MONTEIRO, R., ROELEN, B., BEVERS, M.. Expression of bone morphogenetic protein2 (BMP2), BMP4 and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP2 and BMP4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. **Theriogenology**, v. 63, p. 872–889, 2005.

FERREIRA, E., VIREQUE, A., ADONA, P., MEIRELLES, F., FERRIANI, R., NAVARRO, P.. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, p. 836-848, 2009.

FEUGANG, J. M., CAMARGO-RODRIGUEZ, O., MEMILI, E. Culture systems for bovine embryos. **Livestock Science**, v. 121, p. 141-149, 2009.

FISSORE RA, KUROKAWA M, KNOTT J, ZHANG M, SMYTH J. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. **Reproduction**. v. 124, n. 6, p. 745-754, 2002.

FITZHARRIS, G. MARANGOS, P., CARROLL, J. Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton and cytoplasmic dynein. **Developmental Biology**, v. 305, p. 133–144, 2007.

FLEMING, T. P. A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. **Developmental Biology**, v. 119, n. 2, p. 520-31, 1987.

FOULADI NASHTA, A. A., WADDINGTON, D., CAMPBELL, K. H. S. maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development *in vitro*: a comparative evaluation of antral follicle culture with other methods. **Biology of Reproduction** v. 59, p. 255-262, 1998.

FURNUS, C., MATOS, D., PICCO, S., GARCÍA, P., INDA, A., MATTIOLI, K. G., ERRECALDE, A. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during *in vitro* maturation of cattle oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 109, p. 88-99, 2008.

GILCHRIST, R. B., RITTER, L. J., MYLLYMAA, S., KAIVO-OJA, N., DRAGOVIC, R. A., HICKEY, T. E., RITVOS, O. AND MOTTERSHEAD, D. G. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. **Journal of Cell Science**. v. 119, p. 3811-3821, 2006.

GILCHRIST, R. Recent insights into oocyte follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to *in vitro* maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p. 23–31, 2011.

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

GLISTER C., KEMP C.F. e KNIGHT P.G. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. **Reproduction**, v. 127, p. 239-254, 2004.

GLISTER C., RICHARDS S.L. e KNIGHT P.G. Bone Morphogenetic Protein (BMP) -4, -6, and -7 potently suppress basal and Luteinizing Hormone-Induced androgen production by bovine theca interna cells in primary culture: could ovarian hyperandrogenic dysfunction be caused by a defect in thecal BMP signaling. **Endocrinology**, v. 146, p. 1883-1892, 2005.

GODE F, GULEKLI B, DOGAN E, KORHAN P, DOGAN S, BIGE O, CIMRIN D, ATABEY N. Influence of follicular fluid GDF9 and BMP15 on embryo quality. *Fertility and Sterility*, v. 95, n. 7, p. 2274-2278, 2011.

GOMEZ, E.; DIEZ, C. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.58, n. 1-2, p.23-37, 2000.

GONÇALVES, P. B. D, BARRETA, M. H., SANDRI, L. R., FERREIRA, R. ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 212-217, 2007.

GONÇALVES, P. B. D, BARRETA, M. H., SANDRI, L. R., SIRQUEIRA, L. C.. ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Ciência Veterinária dos Trópicos.**, v.11, p. 135-138, 2008.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Cambridge, 1994.

GOTTARDI, F. P. **Inibição da maturação nuclear pela butirolactona I durante o transporte de oócitos bovinos destinados a produção *in vitro* de embriões (PIV)** 2009, 74 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista - Jaboticabal, 2009.

GURAYA, S. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in spermatozoa. **International Review of Cytology**, v. 199, p. 1-64, 2000.

HALM, S., A.J. IBAÑEZ, C.R. TYLER, F. PRAT. Molecular characterisation of growth differentiation factor 9 (gdf9) and bone morphogenetic protein 15 (bmp15) and their patterns of gene expression during the ovarian reproductive cycle in the European sea bass. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 291, p. 95–103, 2008.

HARDY, K. Cell death in the mammalian blastocyst. **Molecular Human Reproduction** v.3, p. 919–925, 1997

HARVEY, A. J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 113-128, 2007.

HAYASHI M, MCGEE EA, MIN G, KLEIN C, ROSE UM, VAN DUINMe HSUEH AJ. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. **Endocrinology**, v. 140, p. 1236–1244, 1999.

HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in classified bovine oocyte. **Theriogenology**, v. 45, p. 274, 1996.

HREINSSON, J., SCOTT, J., RASMUSSEN, C., SWAHN. M., HSUEH, A., HOVATTA, O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.87, p.316-321, 2002.

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

HUSSEIN, T., THOMPSON, J., GILCHRIST, R. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Developmental Biology**, v. 296, p. 514-521, 2006.

HYTTEL, P., VIUFF, D., FAIR, T., LAUNRICIK, J., THOMSEN, P., CALLESEN, H., VOS, P., HENDRIKSEN, P., DIELEMAN, S., SCHELLANDER, K., BESENFELDER, U., GREVE, T. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Reproduction**, v.122, p.21-30, 2001.

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

ISOBE, N., TERADA, T. Effect of Bovine Follicular Fluid Added to the Maturation Medium on Sperm Penetration in Pig Oocytes Matured *In vitro*. **Journal of International Development and Cooperation**, v.7, p. 59–66, 2001.

ITO, M., IWATA, H., KITAGAWA, H., KON, I., KUWAYAMA, T., MONJI, I. Effect of follicular fluid collected from various diameter follicles on the progression of nuclear

maturation and developmental competence of pig oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 106, p. 421–430, 2008.

JEE, B., LEE, J., SUH, C., KIM, S., MOON, S. Follicular fluid growth differentiation factor-9 concentration and oocyte developmental competence. **J Womens Med** v. 4, n. 1., P. 1-5, 2011.

JOUSAN, F. D., OLIVEIRA, L. J., HANSEN, P. J. Short-Term Culture of *In vitro* Produced Bovine Preimplantation Embryos With Insulin-Like Growth Factor-I Prevents Heat Shock-Induced Apoptosis Through Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 681-688, 2008.

JUENGEL JL e MCNATTY KP. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. **Human Reproduction Update**, v. 11, p. 143–160, 2005.

JUENGEL, J., HUDSON, N., BERG, M., HAMEL, K., SMITH, P., LAWRENCE, S., WHITING, L., MCNATTY, K. Effects of active immunization against growth differentiation factor 9 and/or bone morphogenetic protein 15 on ovarian function in cattle. **Reproduction**, v. 138, p. 107–114, 2009.

KAYANI, A., GLISTER, C. KNIGHT, P. Evidence for an inhibitory role of bone morphogenetic protein(s) in the follicular–luteal transition in cattle. **Reproduction** v. 137, p. 67–78, 2009.

KIM K, MITSUMIZO N, FUJITA K, UTSUMI K. The effects of follicular fluid on *in vitro* maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos. **Theriogenology**. v. 45, n. 4, p. 787-99, 1996.

KLUMPP, A. M. **The effect of holding bovine oocytes in follicular fluid on subsequent fertilization and embryonic development**. 2004. 120 f. Thesis (Master of Science in the Interdepartmental Program in Animal Sciences) - Faculty of the Louisiana State University, 2004.

KNIGHT P, GLISTER C. Potential regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. **Reproduction**, v. 121, p. 503–512, 2001.

KNIGHT, P, GLISTER, C. Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 65–183, 2003.

KNIGHT, P, GLISTER, C. TGF-b superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 132, p. 191–206, 2006.

KNIJN, H. M., WRENZYCKI, C., HENDRIKSEN, P. J. M., VOS, P. L. A. M., HERRMANN, D., VAN DER WEIJDEN, G. C., NIEMANN, H., DIELEMAN, S. J.. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived *in vitro* or *in vivo*. **Reproduction**, v. 124, p. 365–375, 2002.

KNIJN, H. M.; GJORRET, J. O.; VOS, P. L.; HENDRIKSEN, P. J.; VAN DER WEIJDEN, B. C.; MADDOX-HYTTEL, P.; DIELEMAN, S. J. Consequences of *in vitro* development and subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. **Biology Reproduction**, v. 69, p. 1371- 1378, 2003.

KNOBIL, E., NEILL, J. **Physiology of Reproduction**. New York, 2006.

KOBAYASHI, N. MAKOTO ORISAKA, MINGJU CAO, FUMIKAZU KOTSUJI, ARTHUR LEADER, NORIAKI SAKURAGI AND BENJAMIN K. TSANG. Growth Differentiation Factor-9 Mediates Follicle-Stimulating Hormone-Thyroid Hormone Interaction in the Regulation of Rat Preantral Follicular Development. **Endocrinology**, v. 150, p. 5566-5574, 2009.

KRISHER, R., LANE, M., BAVISTER, B. D. Developmental Competence and Metabolism of Bovine Embryos Cultured in Semi-Defined and Defined Culture Media. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1345–1352, 1990.

KUPKER, W.; DIEDRICH, K.; EDWARDS, R. G. Principles of mammalian fertilization. **Human Reproduction**, v. 13, p. 20-32, 1998.

KURAN, M.; ROBINSON, J. J.; STAINES, M. E.; MCEVOY, T. G. Development and de novo protein synthetic activity of bovine embryos produced *in vitro* in different culture systems. **Theriogenology**, v. 55, p. 593-606, 2001.

LANE M.; GARDNER D. K. Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes *in vitro*. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 14, n. 7, p. 398-403, 1997.

LIMA, I., CELESTINO, J., FIGUEIREDO, J. RODRIGUES, A. Papel da Proteína Morfogénica Óssea 15 (BMP-15) e Kit Ligand (KL) na regulação da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.1, p. 3-20, 2010.

LINDEMAN, R.E.; PELEGRI, F. VerTBCCrate maternal-effect genes: insights into fertilization, early cleavage divisions, and germ cell determinant localization from studies in the zebrafish. **Molecular Reproduction and Development**, v.77, p.299-313, 2010.

LIU, L.; TRIMARCHI, J. R.; NAVARRO, P.; BLASCO, M. A.; KEEFE, D. L. Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere sttrition, chromosome instability and apoptosis. **The Journal Biology Chemistry**, v. 26, p. 31998-32004, 2003.

LONERGAN, P.; O'KEARNEY-FLYNN, M.; BOLAND, M. P. Effect of protein supplementation and presence of antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. **Theriogenology**, v. 51, p. 1565-1576, 1999.

MATÁS, C., SANSEGUNDO, M., RUIZ, S., GARCÍA-VÁZQUEZ, F., GADEA, J., ROMAR, R., COY, P. Sperm treatment affects capacitation parameters and penetration. **Theriogenology**, v. 74, p. 1327–1340, 2010.

MAZERBOURG, S. HSUEH, A. Growth differentiation factor-9 signaling in the ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 2002, p. 31-36, 2003.

McNATTY, K., JUENGEL, J., READER, K., LUN, S., MYLLYMAA, S., LAWRENCE, S., WESTERN, A., MEERASAHIB, M., MOTTERSHEAD, D., GROOME, N., RITVOS O, LAITINEN, M.. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-

operate to regulate granulosa cell function in ruminants. **Reproduction**, v.129, p.481-487, 2005.

MCPHERRON, A., LEE, S., GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor- β superfamily containing a novel pattern of cysteines. **The Journal Biology Chemistry**. v. 268, p. 3444–3449, 1993.

MÉO NICIURA, S. C. **Interação núcleo-citoplasmática em embriões e expressão de genes “imprinted” em fetos bovinos produzidos *in vivo*, *in vitro* e partenogênicos**. 2005. 115 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias “Júlio de Mesquita Filho”, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

MINGOTI, G.Z.; GARCIA, J.M., ROSA e SILVA, A.A.M. Steroidogenesis in *cumulus* cells of bovine *cumulus*-oocyte-complexes matured *in vitro* with BSA and different concentrations of steroids. **Animal Reproduction Science**, v.69, p.175-186, 2002.

MOHAN, M., RYDER, S., CLAYPOOL, P.L., GEISERT, R.D., MALAYER, J.R. Analysis of Gene Expression in the Bovine Blastocyst Produced *In vitro* Using Suppression-Subtractive Hybridization. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 447–453, 2002.

MOORE RK AND SHIMASAKI S. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, p. 67– 73, 2005.

MOTTERSHEAD DG, PULKKI MM, MUGGALLA P, PASTERNAK A, TOLONEN M, MYLLYMAA S, KORCHYNSKYI O, NISHI Y, YANASE T, LUN S. Characterization of recombinant human growth differentiation factor-9 signaling in ovarian granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 283, p. 58-67, 2008.

MOTTERSHEAD, D., PULKKI, M., MUGGALLA, P., PASTERNAK, A., TOLONEN, M., MYLLYMAA. S., KORCHYNSKYI, O., NISHI, Y., YANASE, T. Characterization of recombinant human growth differentiation factor-9 signaling in ovarian granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v 283, p. 58–67, 2008.

MOTTERSHEAD, D., WATSON, A. Oocyte peptides as paracrine tools for ovarian stimulation and oocyte maturation. *Molecular Human Reproduction*, v. 15, n. 12, p. 789-794, 2009.

MOZZAQUATRO, F., RUBIN, M., SILVA, C., TESSMANN, J., RAUBER, L., KURTZ FILHO, M, SCHERER, D., BUNN, S. Produção *in vitro* de embriões bovinos em meio suplementado com fontes protéicas definidas e indefinidas. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 1, p. 101-106, 2004.

NEUBER, E.; LUETJENS, C. M.; CHAN, A. W. S.; SCHATTEEN, G. M. Analysis of DNA fragmentation of *in vitro* cultured bovine blastocysts using TUNEL. **Theriogenology**, v. 57, p. 2193-202, 2002.

NILSSON, E., SKINNER, M. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1018-1024, 2002.

ORISAKA, M., ORISAKA, S., JIANG, J., CRAIG, J., WANG, Y., KOTSUJI, F., TSANG, B. Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. **Molecular Endocrinology**, v. 20, p. 2456-2468, 2006.

ORISAKA, M., TAJIMA, K., TSANG, B., KOTSUJI, F. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. **Journal of Ovarian Research**, v.2, n. 9, 2009.

OTSUKA F, MCTAVISH KJ, SHIMASAKI S. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. **Molecular Reproduction Development**, v. 78, n.1 p. 9-21, 2011.

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. 143, p. 4938–4941, 2002.

PANGAS SA, MATZUK MM. The art and artifact of GDF9 activity: *cumulus* expansion and the *cumulus* expansion-enabling factor. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 4, p. 582-585, 2005.

PAYNE, C., SCHATTEN, G. Golgi dynamics during meiosis are distinct from mitosis and are coupled to endoplasmic reticulum dynamics until fertilization. **Developmental Biology** v. 264, p. 50–63, 2003.

PENG, C., ERIC CLELLAND, QIAN TAN. Potential role of bone morphogenetic protein-15 in zebrafish follicle development and oocyte maturation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 153, p. 83–87, 2009.

PERECIN, F. **Epigenética do desenvolvimento em bovinos: DNA metiltransferases e genes “imprinted” em embriões, fetos e placentas**. 2007. 104 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

PERECIN, F., MÉO, S., YAMAZAKY, W., FERREIRA, C., MERIGHE, G., MEIRELLES, F., GARCIA, J. M. Imprinted gene expression *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine embryos and chorio-allantoic membranes. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, p. 76-85, 2009.

PEREIRA, M., COSTA, F., OLIVEIRA, A., SERAPIÃO, R., MACHADO, M., VIANA, J., CAMARGO, L. Quantificação de transcritos maternos em oócitos bovinos submetidos a diferentes condições de maturação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.6, p.1394-1400, 2010

PERINI, A. P., **Separação de espermatozoides “x” superiores, de sêmen congelado, por gradiente descontínuo de Densidade, na produção *in vitro* de embriões Destinados a criopreservação**. 2007 56f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

PETERSON AJ, LEE RS. Improving successful pregnancies after embryo transfer. **Theriogenology**, v. 15, n. 2, p. 687-697, 2003.

PRENTICE, J., SINGH, J., DOCHI, O., ANZAR, M. Factors affecting nuclear maturation, cleavage and embryo development of vitrified bovine *cumulus*-oocyte complexes. **Theriogenology**, v. 75, p. 602–609, 2011.

RICHARD, F. J., SIRARD, M. A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 22-28, 1996.

RIZOS D, WARD F, DUFFY P, BOLAND MP, LONERGAN P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction Development**, v. 61, n. 2, p. 234-248, 2002.

ROMERO-ARREDONDO, A., SEIDEL, G., Effects of Follicular Fluid during *In vitro* Maturation of Bovine Oocytes on *In vitro* Fertilization and Early Embryonic Development. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1012-1016, 1996.

RUA, P., PAULINI, F., OLIVEIRA, G., MOURA, M., ARAÚJO, V., FRANCO, M., RUMPF, R., MELO, E. Expressão de receptores do gene GDF9 e BMP15 em células da granulosa bovina cultivadas *in vitro*. **ANAIS** do 55º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia, 2009.

SASSEVILLE, M, RITTER, L. NGUYEN, T., LIU, F., MOTTERSHEAD, D, RUSSELL, D., GILCHRIST, R. Growth differentiation factor 9 signaling requires ERK1/2 activity in mouse granulosa and *cumulus* cells. **Journal of Cell Science** v. 123, p. 3166-3176, 2010.

SATO H, IWATA H, HAYASHI T, KIMURA K, KUWAYAMA T, MONJI Y. The effect of glucose on the progression of the nuclear maturation of pig oocytes. **Animal Reproduction Science**. V. 99, n. 3-4), p. 299-305, 2007.

SHIMASAKI S, MOORE RK, OTSUKA F, ERICKSON GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. **Endocrine Reviews**, v. 25, p. 72–101, 2004.

SHIMIZU, T., JAYAWARDANA, B., NISHIMOTO, H., KANEKO, E., TETSUKA, M., MIYAMOTO, A. Involvement of the bone morphogenetic protein/receptor system during follicle development in the bovine ovary: Hormonal regulation of the expression of bone

morphogenetic protein 7 (BMP-7) and its receptors (ActRII and ALK-2). **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 249, p. 78–83, 2006.

SILVA, J., LEITÃO, C., BRITO, I. A superfamília dos fatores de crescimento transformante- β e o controle da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.3, p.149-160, 2009.

SIRARD, M., ROY, F., PATRICK, B., MERMILOD, P., GUIBAULT, A. Origin of the follicular fluid added to the media during bovine IVM influences embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, p. 25-94, 1995;

SIRARD, M. FRANÇOIS RICHARD, PATRICK BLONDIN, CLAUDE ROBERT. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, p. 126–136, 2006.

SIRARD, M. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v.55, p.1241-1254, 2001.

SIRARD, M., DESROSIER, S., ASSIDI, M. *In vivo* and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**, v. 688, p. 871-876, 2007.

SIRARD, M.A., BLONDIN, P. Oocyte maturation and IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**. v. 42, p. 417–426, 1996.

SOUZA, F., CANISSO, I., OSÓRIO, J. Algumas particularidades no envelhecimento do gameta feminino. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 7, n. 3, p. 273-279, 2009.

SPICER, L, AAD, P, ALLEN, D, MAZERBOURG, S, PAYNE, A., HSUEH, A. Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) Stimulates Proliferation and Inhibits Steroidogenesis by Bovine Theca Cells: Influence of Follicle Size on Responses to GDF9. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 243–253, 2008.

SU YQ, SUGIURA K, EPPIG JJ. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of *cumulus* cell metabolism. **Seminars in Reproduction Medical**. v. 27, n. 1, p. 32-42, 2009

SUGIURA, K., PENDOLA, F., EPPIG, J. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: Energy metabolism. **Developmental Biology**, v. 279, p. 20–30, 2005.

THERIEN, I., SOUBEYRAND, S., AND MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. **Biology of Reproduction**, v.57, p. 1080–1088, 1997.

TOMEK, W., TORNER, H., KANITZ, W. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes *in vitro*. **Reproduction of Domestic Animal**, v.37, p.86-91, 2002.

VIANA, K., CALDAS-BUSSIÈRE, M., MATTA, S., , M., PAES DE CARVALHO, C., DIAS, B., QUIRINO, C. Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 102, p. 217-227, 2007.

VITT, U.A., HAYASHI, M., KLEIN, C., HSUEH, A.J. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and pre-ovulatory rat follicles. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 370–377, 2000

WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., CARNWATH, J. W., NIEMANN, H. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. **Human Reproduction**, v. 16, p. 893-901, 2001.

YAMAMOTO N, CHRISTENSON LK, MCALLISTER JM, STRAUSS JF 3RD. Growth differentiation factor-9 inhibits 3'5'-adenosine monophosphate-stimulated steroidogenesis in human granulosa and theca cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. v. 87, n. 6, p. 2849-2856, 2002.

YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P. E. J.; PRESICCE, G. A. Control of oocyte maturation in cows – Biological factors. **Theriogenology**, v. 49, p. 471-482, 1998.

YEO, C., GILCHRIST, R., THOMPSON, J., LANE, M. Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. **Human Reproduction**, v. 23, n.1 p. 67–73, 2008.

ANEXO

RELAÇÃO DOS MEIOS E SOLUÇÕES UTILIZADOS

Anexo 1: PBS Completo e PBS Ca⁺² Mg⁺² Free

Componentes	PBS Completo	PBS Ca ⁺² Mg ⁺² Free
Água Milli-Q q.s.p.	1L	1L
NaCl (137mM/171mM)	8g	10g
KCl (2,7mM/3,4mM)	0,2g	0,25g
Na ₂ HPO ₄ -Anidro (8mM)	1,15g	-
Na ₂ HPO ₄ -12H ₂ O (4mM)	-	1,44g
KH ₂ PO ₄ (1,5mM/1,8mM)	0,2g	0,25g
CaCl ₂ -2H ₂ O (0,7mM)	0,1g	-
MgCl ₂ -6H ₂ O (0,5mM)	0,1g	-
DL-Glucose (5,5mM)	1g	-
Antibiótico (anexo 19)	5mL	-

Anexo 2: Meio de Lavagem de Oócitos (TCM 199 Hepes)

Solução Mãe TCM 199 Hepes	10mL
Água Milli-Q	10mL
TCM 199	0,095g
Bicarbonato de Sódio (5mM)	0,0042g
Hepes Sódico (10mM)	0,026g
Hepes Ácido (10mM)	0,024g

Meio de Lavagem	10mL
Solução Mãe TCM 199 Hepes	9mL
SFB (anexo 20)	1mL
Estoque C (Piruvato) (anexo 17)	20µL
Antibiótico (anexo 19)	50µL

Anexo 3: Meio de Maturação de Oócitos (TCM 199 Bicarbonato)

Solução Mãe TCM 199 Bicarbonato	10mL
Água Milli-Q	10mL
TCM 199	0,095g
Bicarbonato de Sódio (26mM)	0,022g

Meio de Maturação	10mL
Solução Mãe TCM 199 Bicarbonato	9mL
SFB (anexo 20)	1mL
Estoque C (Piruvato) (anexo 17)	20µL
Antibiótico (anexo 19)	50µL
FSH (anexo 4)	10µL
LH (anexo 5)	100µL

* Adicionar 10µL Estradiol após a filtragem.

Anexo 4: FSH (1µg/µL)

Componentes	31mL
TCM 199 Bicarbonato (anexo 3) ou PBS Completo (anexo 1)	31mL
Pluset [®] (500UI = 31,25mg de FSH)	500UI

Anexo 5: hCG (5µg/µL)

Componentes	2mL
TCM 199 Bicarbonato (anexo 3) ou PBS Completo (anexo 1)	2mL
Profasi [®] (2000UI = 0,01g de hCG)	2000UI

Anexo 6: Estradiol 17β (1µg/µL)

Componentes	1mL
Etanol Absoluto	1mL
Estradiol 17β	0,001g

Anexo 7: Solução TL-Stock e TL-Sêmen

Componentes	TL-Stock	TL-Sêmen
	25mL	
Água Milli-Q	25mL	25mL
NaCl (114mM/100mM)	0,166g	0,145g
KCl (3mM/3mM)	0,006g	0,00575g
MgCl ₂ -6H ₂ O (0,5mM/0,4mM)	0,002g	0,002g
NaH ₂ PO ₄ -Anidro (0,3mM)	0,00117g	0,0010g
Bicarbonato de Sódio (25mM)	0,0525g	0,0525g
CaCl ₂ -2H ₂ O (2mM)	0,0075g	0,0075g
DL-Ácido Lático (60%) (12mM/26mM)	35,7µL	77,5µL
<i>Phenol Red</i> (30µM)	0,0003g	0,0003g
Hepes Ácido (10mM)	-	0,0595g

Anexo 8: Solução de Percoll 90%

Componentes	2,0ml
Percoll	1,8mL
Solução 10X (anexo 9)	200µL
Estoque CaCl ₂ (1M) (anexo 12)	4µL
Estoque MgCl ₂ (100mM) (anexo 13)	7,8µL
DL-Ácido Lático (60%) (26,4mM)	7,4µL
Bicarbonato de Sódio (20mM)	0,0042g

Anexo 9: Solução 10X para Percoll

Componentes	10mL
Água Milli-Q	10mL
Estoque KCl (1M) (anexo 10) (31mM)	0,309mL
Estoque NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O (100mM) (anexo 11) (3mM)	0,292mL
NaCl (800mM)	0,4675g
Hepes Ácido (50mM)	0,119g
Hepes Sódico (50mM)	0,130g

Anexo 10: Estoque KCl (1M)

Componentes	1mL
Água Milli-Q	1mL
KCl	0,0745g

Anexo 11: Estoque NaH₂PO₄-H₂O (100mM)

Componentes	1mL
Água Milli-Q	1mL
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	0,0138g

Anexo 12: Estoque CaCl₂ (1M)

Componentes	10mL
Água Milli-Q	10mL
CaCl ₂ -2H ₂ O (1M)	1,47g

Anexo 13: Estoque MgCl₂ (100mM)

Componentes	10mL
Água Milli-Q	10mL
MgCl ₂ -6H ₂ O (100mM)	0,203g

Anexo 14: Meio FIV-Gotas

Componentes	4,0mL
TL-Stock (anexo 7)	3,6mL
Antibiótico (anexo 19)	20μL
Estoque C (Piruvato) (anexo 17)	8μL
PHE (anexo 15)	160μL
Heparina (anexo 16)	40μL
BSA (FIV) (6mg/mL)	0,024g

Anexo 15: PHE

Solução pH 4,0		50mL
Água Milli-Q		50mL
DL-Ácido Lático (60%) (29,4mM)		0,165g
Bisulfito de Sódio		0,050g

Soluções Mãe	Penicilamina	Hipotaurina	Epinefrina
Salina 0,9%	10mL	10mL	-
D-Penicilamina (2mM)	0,003g	-	-
Hipotaurina (1mM)	-	0,0011g	-
Solução pH 4,0	-	-	40mL
Epinefrina (245 μ M)	-	-	0,0018g

PHE final		11mL
D-Penicilamina		2,5mL
Hipotaurina		2,5mL
Epinefrina		2mL
Salina 0,9%		4mL

Anexo 16: Heparina (176UI)

Componentes	1mL
TL-Stock (anexo 7)	1mL
Heparina (176UI/mg)	0,003g

Anexo 17: Meio SOF

Soluções Estoque	A	B	C	D	L-Glutamina
	S. Sais	S. Bicarb	S. Piruvato	S. CaCl ₂	
Água Milli-Q	9,84mL	10mL	500µL	1mL	1mL
NaCl (1,1M)	0,629g	-	-	-	-
KCl (72mM)	0,0534g	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄ (12mM)	0,0162g	-	-	-	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O (7,4mM)	0,0182g	-	-	-	-
DL-Ácido Lático (60%) (50µM)	60µL	-	-	-	-
Bicarbonato de Sódio (250mM)	-	0,210g	-	-	-
<i>Phenol Red</i> (260µM)	-	0,001g	-	-	-
Piruvato Sódico (100mM)	-	-	0,0055g	-	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O (178mM)	-	-	-	0,0262g	-
L-Glutamina (200mM)	-	-	-	-	0,02923g

SOF estoque	20mL
Água Milli-Q	15,6mL
Estoque A	2mL
Estoque B	2mL
Estoque D	200µL
L-Glutamina	20µL
BME Essenciais (50X) (anexo 22)	200µL
MEM Não-Essenciais (100X) (anexo 23)	200µL
Myo-Inositol (2,8mM)	0,01g
Tri-Citrato de Sódio Di-Hidratado (340µM)	0,002g

Meio SOF final (SOF estoque + 2,5% de SFB+ 5mg BSA/mL):

SOF final	10mL
SOF estoque	9,68mL
Estoque C	20µL
Antibiótico (anexo 19)	50µL
BSA (CIV) (5mg/mL) ou (6mg/mL)	0,05g 0,06g
SFB (anexo 20)	250µL

Anexo 18: Antibiótico

Componentes	30mL
Água Milli-Q	30mL
Sulfato de Amicacina (16,67µg/µL)	500mg

Anexo 19: Aminoácidos BME (50X)

Componentes	100mL
Água Milli-Q	100mL
L-Cistina (2,5mM) *	0,060g
L-Histidina (Free Base) (2,6mM) *	0,040g
L-Isoleucina (10mM) *	0,130g
L-Leucina (10mM) *	0,130g
L-Metionina (2,5mM) *	0,0375g
L-Fenilalanina (5mM) *	0,0825g
L-Treonina (10mM) *	0,120g
L-Triptofano (1mM) *	0,020g
L-Tirosina (5mM) *	0,090g
L-Valina (10mM) *	0,1175g
L-Arginina (6mM)	0,105g
L-Lisina (12,6mM)	0,1849g

Anexo 20: Aminoácidos MEM (100X)

Componentes	100mL
Água Milli-Q	100mL
L-Alanina (10mM)	0,089g
L-Asparagina (10mM)	0,150g
L-Ácido Aspártico (10mM)	0,133g
L-Prolina (10mM)	0,115g
L-Serina (10mM)	0,105g
L-Ácido Glutâmico (9mM) *	0,147g
Glicina (10mM) *	0,075g

Anexo 21: Solução estoque de HOECHST

Componentes	1 mL
HOECHST (bisbenzímide) (SIGMA Cat. B2261)	0,001g
PBS (Anexo 1)	1 mL
PVA	0,001g

Componentes	1 mL
HOECHST (Anexo 29)	10 µL
PBS (Anexo 1)	1 mL

Anexo 22: Solução Tyrodes ácida

Componentes	100mL
Água Milli-Q	100mL
NaCl (0,14 M)	0,8 g
KCl (2,7 mM)	0,02 g
MgCl ₂ .6H ₂ O (0,5 mM)	0,01 g
CaCl ₂ .2H ₂ O (1,7 mM)	0,02 g
Glicose (5,5 mM)	0,1 g
PVA (0,1%)	0,1 g

*Ajustar pH 2,1 com HCl 1N

Anexo 23: Solução formaldeído 3%

Componentes	10mL
PBS	10 mL
Formaldeído Mallinckrodt 5016 (3%)	300 µL

Anexo 24: Solução de bloqueio

Componentes	100mL
PBS	100 mL
BSA (1 mg/mL)	0,1 g
Glicina (100 mM)	0,7507 g
Azida de sódio (0,2%)	0,2 g

Anexo 25: Solução 0,1% de Triton X-100

Componentes	10mL
Solução de bloqueio	10 mL
Triton X-100 USB 22686 (0,1%)	10 µL

Anexo 26: Solução iodeto de propídio

Componentes	100mL
Solução salina	100 µL
Iodeto de propídio Sigma® – P-4170 (1 µg/µL)	100 µg

Anexo 27: Solução FITC-LCA (*Lens culinaris*)

Componentes	10mL
PBS ou Água Milli-Q	10 mL
Lecitina (10 µg/µL)	0,01 g