

GUSTAVO BRUNO MOTA

**EFEITO DA INSULINA NA COMPETÊNCIA DE OÓCITOS
BOVINOS MATURADOS EM MEIO DEFINIDO**

Brasília-DF
2013

GUSTAVO BRUNO MOTA

**EFEITO DA INSULINA NA COMPETÊNCIA DE OÓCITOS
BOVINOS MATURADOS EM MEIO DEFINIDO**

Tese apresentada à Universidade de Brasília, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Ciências Médicas, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Brasília
Distrito Federal – Brasil
2013

*Aos meus pais, Magno José Mota e
Maria Elizabeth Bruno Mota,
à minha esposa Daianne Rodrigues Mota
e à minha filha Maria Antonia Rodrigues Bruno Mota*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por luminar meus passos e abençoar minhas decisões desde sempre.

Aos meus pais, Magno José Mota e Maria Elizabeth Bruno Mota, pelo amor incondicional, apoio e por terem sempre alguma palavra nos bons e maus momentos.

A minha esposa Daianne Rodrigues Mota, pelo amor, carinho, paciência e ser minha companheira desde o primeiro ano aqui em Brasília. Sem você tudo seria mais difícil!!!! Amo você!!!!

A minha filha Maria Antônia Rodrigues Bruno Mota que está pertinho de nascer. Papai está esperando ansioso a sua chegada. Amo você!!!!

As minhas irmãs Camila e Mariana, por serem meus amores e sempre torcerem por mim.

Aos amados sobrinhos Caio Mota Francisco Horta e Heitor Mota Francisco Horta. Vocês são a alegria que se renova a cada dia em nossa família. Saudades!!!!

A Leonardo Francisco Horta pela amizade e participação na família Mota.

A todos os familiares, pela torcida.

A professora Alzira Amélia Martins Rosa e Silva pela amizade, orientação e por conceder a oportunidade dos estudos de Pós-Graduação na área de Reprodução na Universidade de Brasília.

Ao pesquisador Luiz Sérgio de Almeida Camargo, por ter concedido a oportunidade das análises de PCR Real Time na Embrapa Gado de Leite, pelos ensinamentos passados desde o mestrado e amizade.

As amigas Ingrid Oliveira e Silva, Camila Soares Nobre, Daniele Cristiane e Flavia Tuany pelo companheirismo e ajuda direta e incondicional que ofereceram para a execução dos trabalhos.

A equipe do Laboratório de Reprodução que de alguma forma contribuíram, Silene, Carolina, Tiago, Valter e Daniele Kaiser

Ao Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, em especial Michele Munk Pereira pelo apoio nas etapas relacionadas à expressão gênica.

Aos amigos do Banco do Brasil, que aguentaram eu sempre falar que tinha uma Tese de Doutorado pra terminar, Paulo Cesar "Psy", Adroaldo "Remanso", Lislely, Tiago, Elaine, Eder, Gilsa, Aline Tiete, Aline Kassia, André, Valeria, Valter, Renato "Tim", Renato Rosa, Ivan, Marcelo, "Junim", Edilene, Marcelo, Anderson e Daniel.

Aos Professores da UnB pelos ensinamentos e orientações.

Ao Frigorífico Friboi e os funcionários João e “Seu Nego” por cederem os ovários das fêmeas bovinas para a realização dos trabalhos.

BIOGRAFIA

GUSTAVO BRUNO MOTA, filho de Magno José Mota e Maria Elizabeth Bruno Mota, nascido em Barra Mansa, no Estado do Rio de Janeiro, em 2 de maio de 1979.

Em março de 2000, iniciou o curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), em Campos dos Goytacazes – RJ, graduando-se em 14 de maio de 2005.

Em maio de 2006, iniciou o Programa de Pós Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, na área de reprodução animal, graduando-se Mestre em 4 de março de 2008.

Em julho de 2008, iniciou o Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas, em nível de Doutorado, na Universidade de Brasília, na área de reprodução animal, submetendo-se à defesa de tese em 28 de junho de 2013.

LISTA DE TABELAS

	Página
1- Sequência dos <i>primers</i> específicos, temperaturas de pareamento, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no GeneBank	39
2- Efeito da insulina em meio definido de MIV de CCOs nas taxas de clivagem e produção de blastocistos bovinos.....	56

LISTA DE FIGURAS

	Página
1- Etapas de extração de transcritos e reação de PCR.....	40
2- Curvas de dissociação dos genes GDF9 (A) e GLUT1 (B) obtidas após amplificação do PCR em tempo real.....	41
3- Curvas de dissociação dos genes, PRDX1 (C), HSP 70.1 (D) obtidas após amplificação do PCR em tempo real.....	42
4- Curvas de dissociação dos genes β -Actina (E), GAPDH (F) obtidas após amplificação do PCR em tempo real.....	43
5- Efeito da insulina nas taxas de maturação nuclear de oócitos maturados em meio definido por 24h.....	45
6- Abundância relativa de transcritos relacionados a maturação (GDF9) e captação de glicose (GLUT1) em oócitos bovinos maturados em meio Alpha-MEMB.....	53
7- Abundância relativa de transcritos relacionados a estresse celular (PRDX1 e HSP 70.1) em oócitos bovinos maturados em meio Alpha-MEMB.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

Alpha MEM: Meio mínimo essencial Alpha
AMPc : Adenosina monofosfato cíclica
BSA: Albumina Sérica Bovina
CCOs: Complexos *cumulus*-oócito
cDNA: DNA complementar
CGPs: Células germinativas primordiais
CIV: Cultivo *in vitro*
CR2aa: Meio de cultivo Charle Ronsenkrans
DNA: Ácido Desoxirribonucléico
EGF: Fator de crescimento epidermal
FPM: Fator promotor de maturação
FSH: Hormônio folículo estimulante
GDF9: Fator de crescimento e diferenciação 9
GLUT1: Transportador de Glicose 1
GSH: Glutathiona
GSK3: Glicogênio Sintase Quinase 3
H₂O₂ : Água oxigenada
HSP70.1: Proteína do choque térmico 70.1
IA: Inseminação artificial
IGF-1: Fator de crescimento semelhante a insulina I
INPI: Instituto Nacional de Pesquisa Industrial
IR: Receptor de insulina
IR-β: Receptor de insulina β
IRS: Substrato de receptor de insulina
ITS: Insulina-Transferrina- Selênio
LH: Hormônio Luteinizante
MEM: Meio mínimo essencial
MIV: Maturação *in vitro*
MN: Maturação nuclear
MII: Metáfase II
O₂ : Oxigênio
PBS: Tampão Fosfato Salino

PKA2: Proteína quinase A 2
PCR: Reação em cadeia de polimerase
PI3-K: Fosfatidil Inositol 3 quinase
PIV: Produção in vitro
PRDX1: Peroxirredoxina 1
PVA: Álcool Polivinílico
PVP: Polivinil Pirrolidona
RNA: Ácido Ribonucléico
RNAm: Ácido Ribonucléico mensageiro
ROS: Espécies reativas de oxigênio
RVG: Rompimento da Vesícula Germinativa
SFB: Soro Fetal Bovino
TCM199: Meio de cultura de tecido 199
TE: Transferência de embriões
ZP: Zona pelúcida

RESUMO

MOTA, Gustavo Bruno; Universidade de Brasília, julho de 2013 . **Efeito da insulina na competência de oócitos bovinos maturados em meio definido**. Orientadora: Alzira Amélia Martins Rosa e Silva

A adição de soro nos meios de maturação *in vitro* (MIV) de complexos *cumulus*-oócito (CCOs) é prática comum em laboratórios de pesquisa e comerciais. A adição de fatores de crescimento ou hormônios nos meios de MIV tem sido uma alternativa ao uso de soro além de proporcionar um maior conhecimento das necessidades dos gametas em condições *in vitro*. A insulina é um hormônio anabólico e possui efeitos sinérgicos ao FSH melhorando o *Crosstalk* células do *cumulus*-oócito. Objetivou-se neste trabalho avaliar a adição de insulina em doses crescentes em meio Alpha MEM livre de soro contendo FSH, utilizando como parâmetros de avaliação a taxa de maturação nuclear, a quantificação de transcritos associados ao metabolismo, competência oocitária e estresse celular além do desenvolvimento embrionário. Os CCOs selecionados foram distribuídos aleatoriamente entre os cinco tratamentos de MIV: T1 (controle): TCM199 + 10% SFB (TCM); T2: Alpha-MEMB (A-MEM i0); T3: Alpha-MEMB + 1ng/mL insulina (A-MEM i1); T4: Alpha-MEMB + 10ng/mL insulina (A-MEM i10); T5: Alpha-MEMB + 100ng/mL insulina (A-MEM i100). Não houve diferença entre os tratamentos para oócitos encontrados no estágio intermediário (metáfase I à telófase I) ao término da MIV. Porém, o tratamento controle apresentou menor percentual de oócitos imaturos que os demais tratamentos, assim como maior taxa de oócitos em Metáfase II (MII) que os tratamentos A-MEM i0, A-MEM i1, A-MEM i10. O tratamento A-MEM i100 apresentou percentual de oócitos em MII semelhante ao tratamento controle. O RNAm total foi extraído de três *pools* de oócitos maturados nos tratamentos em meio Alpha MEM (4 tratamentos) e usados para gerar cDNA. A abundância relativa dos transcritos GDF9, GLUT1, PRDX1 e HSP70.1 foi analisada por Real Time-PCR utilizando A-MEMi0 com calibrador. Maior quantidade de transcrito GDF9 foi encontrada em meio A-MEMi0 que os demais tratamentos. Não houve diferença na quantidade relativa do transcrito GLUT1 entre os tratamentos. O transcrito PRDX1 foi menos expresso em A-MEMi10 e A-MEMi100 do que A-MEMi0. HSP70.1 foi menos expresso em oócitos maturados em meio A-MEMi1, A-MEMi10 e A-MEMi100.

Na etapa de FIV, CCOs dos 5 tratamentos foram maturados, fertilizados e os possíveis zigotos cultivados *in vitro* por oito dias. As taxas de clivagem foram obtidas 48h após início do cultivo e as taxas de blastocistos oito dias após fecundação. As taxas de clivagem foram semelhantes entre todos os tratamentos. Apenas o meio A-MEMi100 apresentou maior taxa de produção de blastocistos comparado ao meio A-MEMi0. Todas as demais comparações não apresentaram diferença entre si. Em conclusão, a adição de 100ng/mL de insulina em meio Alpha MEM aumenta a produção de embriões. Além disso, a insulina é capaz de diminuir a expressão de transcritos associados ao estresse celular causado em condições de cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

MOTA, Gustavo Bruno, Universidade de Brasília, June 2013. Effect of insulin on the competence of bovine oocytes in defined medium. Adviser: Alzira Amélia Martins Rosa e Silva.

The addition of serum on in vitro maturation medium (IVM) of cumulus-oocytes complexes (COCs) is common practice in research and commercial laboratories. The addition of growth factors or hormones in IVM media has been an alternative to the use of serum to providing a better understanding of the needs of the gametes on in vitro conditions. Insulin is an anabolic hormone with FSH synergistic effects to improve the crosstalk oocyte-cumulus cells. The objective of this study was to evaluate the addition of insulin in increasing doses in Alpha MEM medium serum free plus FSH, using as evaluation parameters to nuclear maturation rate, quantification of transcripts associated with metabolism, cellular stress and oocyte competence and production of embryos. The COCs were randomly distributed among the five IVM treatments: T1 (control): TCM199 + 10% FCS (TCM), T2: Alpha-MEMB (A-MEM i0), T3: Alpha-MEMB + 1ng/mL insulin (A-MEMi1), T4: Alpha-MEMB + 10ng/mL insulin (A-MEM i10), T5: Alpha-MEMB + 100ng/ml insulin (A-MEM i100). There was no difference between treatments for oocytes found in the intermediate stage (metaphase I to telophase I) at the end of IVM. However, the control treatment showed the lowest percentage of immature oocytes than the other treatments, as well as higher rate of oocytes in metaphase II (MII) than treatments A-MEM i0, A-MEM i1, A-MEMi10. The A-MEM i100 percentage of MII oocytes was similar to control. Total mRNA was extracted from three pools of oocytes matured in Alpha MEM medium treatments (4 treatments) and used to generate cDNA. The relative abundance of transcripts GDF9, GLUT1, PRDX1 and HSP70.1 was analyzed by Real-Time PCR using A-MEMi0 as calibrator. Greater amount of GDF9 transcript was found in the A-MEMi0 than the other treatments. There was no difference in the relative amount of the transcript GLUT1 between treatments. The PRDX1 transcript was downregulated in A-MEMi10 and A-MEMi100. HSP70.1 was downregulated in oocytes matured in A-MEMi1, A-MEMi10 and MEMi100. In step IVF, COCs were matured of the five treatments. Cleavage rates were obtained 48 hours after the beginning of cultivation and blastocyst rates eight days after fertilization. Cleavage rates were similar among all treatments. The A-MEMi100 showed the highest blastocyst production compared to A-MEMi0. All other comparisons showed no

difference. In conclusion, the addition of 100ng/ml insulin in MEM Alpha medium increases the production of embryos, however smaller doses tested did not promote increased. Moreover insulin is able to decrease the expression of transcripts related to cellular stress caused by in vitro culture conditions.

Sumário

1-INTRODUÇÃO	16
2-REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1-Oogênese e Foliculogênese	19
2.2- MIV de CCOs bovinos	21
2.3-Uso do soro na maturação <i>in vitro</i> de oócitos	24
2.4-Meio Alpha-MEM na maturação <i>in vitro</i> de oócitos	26
2.5-Insulina na maturação <i>in vitro</i> de oócitos	29
2.6-Análise de transcritos em oócitos	32
3-OBJETIVOS	34
4-MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1-Local	34
4.2-Coleta dos ovários e seleção dos CCOs.....	35
4.3-Maturação <i>in vitro</i>	35
4.4- Fecundação <i>in vitro</i> dos CCOs.....	36
4.5- Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões.....	37
4.6-Avaliação da taxa de maturação nuclear	37
4.7-Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA).....	37
4.8-PCR em tempo real	39
4.9-Análise estatística	40
5-RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1-Avaliação da taxa de maturação nuclear de oócitos maturados em meio definido contendo diferentes concentrações de insulina	46
5.2-Quantificação de transcritos armazenados em oócitos bovinos maturados em meio definido contendo diferentes concentrações de insulina	49
5.3- Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos maturados em meio definido contendo diferentes concentrações de insulina	57
6-CONCLUSÃO	62
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

Efeito da insulina na competência de oócitos bovinos maturados em meio definido

1-INTRODUÇÃO

Para atender a necessidade de multiplicação de animais de genética superior, algumas biotécnicas reprodutivas há muito vem sendo utilizadas em bovinos e outras espécies. Dentre as biotecnologias reprodutivas empregadas em bovinos, a produção *in vitro* (PIV) de embriões tem tido amplo sucesso alcançando escala comercial e colocando o Brasil em papel de destaque no cenário mundial. Comparada à inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE), a PIV é capaz de acelerar o ganho genético por encurtar ainda mais o intervalo de gerações.

Apesar da aplicabilidade estabelecida, alguns aspectos da PIV limitam melhores resultados motivando a busca por respostas de diversos grupos de pesquisa. É sabido que nos sistemas de PIV de embriões, a qualidade dos oócitos obtidos e a maturação *in vitro* (MIV) são determinantes para o sucesso da técnica. Apesar de oócitos oriundos de maiores folículos responderem por melhores índices na PIV (Lonergan *et al.*, 1994), o diâmetro dos folículos não indica se os mesmos estão em crescimento ou atresia. Além disso, a população de oócitos aspirados de folículos antrais é muito heterogênea quanto a capacidade de desenvolvimento *in vitro* (Otoi *et al.*, 1997). A remoção do oócito do ambiente folicular interrompe a inibição da maturação nuclear levando muitas vezes a finalização da meiose sem

que o citoplasma tenha atingido maturação molecular adequada (Bevers e Izadyar, 2002). Mesmo que ocorra a fertilização *in vitro*, a assincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática pode comprometer o desenvolvimento embrionário inicial já que até a transição do genoma embrionário, o estoque de proteínas e transcritos maternos coordenam os mecanismos celulares que ocorrem nas primeiras clivagens (Gandolfi e Gandolfi, 2001).

Na busca por condições ideais para o cultivo celular, verificou-se que a suplementação dos meios de cultura com soro sanguíneo é essencial para o crescimento e proliferação celular (efeito mitogênico) (Gstraunthaler, 2003). De fato, o soro (fetal, neonato, vaca em estro, humano) apresenta uma série de fatores necessários aos sistemas de cultivo *in vitro* (aminoácidos, proteínas, vitaminas, substratos energéticos) (Price e Gregory, 1982). No entanto sua aplicação traz alguns aspectos negativos. A composição e razão dos constituintes do soro são variáveis (Price e Gregory, 1982), sendo o meio de cultivo suplementado por soro classificado como quimicamente não definido. Tal condição impede que a real necessidade do gameta feminino seja determinada. Além disso, existe diferença entre partidas de soro utilizadas, o que pode provocar variações inesperadas nos resultados (Bavister, 1995). Não obstante, o soro é fonte potencial de contaminantes microbiológicos como fungos, bactérias, vírus ou prions (Gstraunthaler, 2003).

Na tentativa de se conhecer melhor as necessidades do oócito como também sua resposta a um ambiente artificial durante a maturação, os meios quimicamente definidos (livres de soro) tem se mostrado de grande utilidade. Além disso, dessa forma é possível padronizar os meios e eliminar os efeitos negativos causados pela adição de soro.

Na MIV de CCOs bovinos o meio Alpha-MEM com suplementos, mas livre de soro, demonstrou progressão mais lenta da meiose (Vireque, 2003), porém inibição da maturação nuclear (Oliveira e Silva *et al.*, 2010). Ao longo da 24h de cultivo, análises de microscopia eletrônica apontaram sinais de progressão de maturação citoplasmática (Oliveira e Silva *et al.*, 2010). Tais trabalhos apontam a possibilidade de uma sincronia mais eficiente entre a maturação nuclear e a citoplasmática quando do uso do Alpha-MEM e suplementos.

A insulina é um hormônio anabólico que é essencial para a manutenção da homeostase de glicose e proliferação e diferenciação celular. Amsterdam *et al.* (1998) verificaram que a insulina e o FSH atuam de maneira sinérgica no cultivo *in vitro* de células da granulosa de suínos, por promoverem aumento de formação de *gap junctions*, maior desenvolvimento do retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e complexo de golgi. Em bovinos, a insulina na presença do FSH é capaz de estimular a proliferação e esteroidogênese de células da granulosa de maneira dose dependente (Gutiérrez *et al.*, 1997). Um sistema de cultivo que não altere as características morfológicas e funcionais das células somáticas que circundam o oócito pode em princípio favorecer um adequado *crosstalk* entre o oócito e as células do cumulus favorecendo o sistema de MIV.

Dessa forma, o presente trabalho reuniu informações de desenvolvimento *in vitro* e expressão dos genes GDF9, GLUT1, HSP70.1 e PRDX1 em CCOs maturados em meio Alpha- MEM e suplementos, acrescido de doses crescentes de insulina.

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1-Oogênese e Foliculogênese

A transformação das oogônias em oócitos ou oogênese é completada em todos os mamíferos domésticos durante a vida fetal ou logo após o nascimento. Estima-se uma população de 120 a 150 mil oócitos primários contidos em folículos primordiais em fêmeas bovinas ao nascimento (Yang *et al.*, 1998).

As células do epiblasto, durante a gastrulação, se tornam células germinativas primordiais (CGPs). Estas por sua vez migram até as gônadas em formação onde apresentam alta atividade mitótica e transcricional (Picton *et al.*, 1998). As CGPs se tornam oogônias e são circundadas por células somáticas para formarem os cordões corticais. A partir de então, as oôgonias entram em meiose tornando-se oócitos. Os oócitos passam pelas fases de leptóteno, zigóteno e paquíteno até ficarem “parados” na fase de diplóteno da prófase I.

Coincidente com a parada da primeira divisão meiótica, tem-se a formação dos folículos primordiais, caracterizados por oócitos rodeados por uma camada de células da granulosa (CGs) achatadas ou achatadas e cuboidais, posteriormente folículos primários, rodeados por uma camada simples de CGs cuboidais e folículos secundários circundados por duas ou mais CGs cuboidais (Basso e Esper, 2002). Durante a fase de folículo secundário, o oócito apresenta intenso crescimento com marcante síntese de RNA e proteínas, aumento no número de ribossomos, mitocôndrias e reorganização das organelas existentes. É ainda durante esta fase que se tem o surgimento dos grânulos corticais e a formação da zona pelúcida (ZP) (Hyttel *et al.*, 1997).

O desenvolvimento desses folículos pré-antrais é conduzido por fatores locais que controlam a proliferação e diferenciação das células da granulosa, promovendo o crescimento folicular e oocitário. Ao longo do crescimento oocitário, junções comunicantes (*gap junctions*) são formadas e possibilitam a comunicação bidirecional entre o oolema e as CGs. Nutrientes, precursores metabólicos, sinais hormonais e sinais inibitórios ou estimulatórios da meiose são transferidos por essa via (Van den HURK e ZAO 2005).

Durante o desenvolvimento folicular, sob provável ação conjunta do hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), activina, e c-kit ligante (ligante de um receptor tirosina-quinase), a cavidade antral (antro) é formada e se desenvolve até o folículo atingir seu diâmetro próximo ao ovulatório. Em folículos de cerca de 3 mm de diâmetro, o oócito pode atingir seu diâmetro final associado com quase completa inatividade transcricional (Fair *et al.*, 1995).

Segundo Ginther (2000) quando os folículos de fêmeas bovinas atingem aproximadamente 4 mm, entram na fase de recrutamento, posteriormente seleção e finalmente dominância folicular ao atingirem cerca de 8mm. Quando apresentam de 7,7 a 8,0 mm, inicia-se a fase de desvio, a qual é caracterizada pelo contínuo crescimento do maior folículo, e bloqueio do crescimento dos folículos subordinados. A fase de crescimento do folículo dominante está associada com alta frequência de pulsos de LH. Hyttel *et al.* (1997) destacaram que durante o crescimento do folículo dominante, diversas alterações ocorrem no interior do oócito como aumento nos níveis de lipídeo e posicionamento mais superficial dos grânulos corticais. A etapa entre o final do crescimento e início da maturação *in vivo* com o pico pré-ovulatório de LH tem sido denominada capacitação oocitária.

Logo após o pico pré-ovulatório de LH os oócitos retomam a meiose atingindo a maturação nuclear e citoplasmática. O objetivo da maturação final do oócito é que este se torne equipado com os componentes necessários para o sucesso da fertilização e desenvolvimento inicial do embrião (Hyttel *et al.*, 1997). O correto número e disposição de mitocôndrias, grânulos corticais e demais organelas, além de estoques suficientes de RNAs e proteínas envolvidas na complexidade de eventos que se passam no interior do gameta feminino irão conferir ao mesmo, competência molecular, citoplasmática e nuclear.

Com relação ao processo de maturação nuclear, na prófase I ocorre a reversão do primeiro bloqueio meiótico. Neste momento, o oócito apresenta condensação gradual da cromatina, desaparecimento do nucléolo e desintegração da membrana nuclear. A meiose prossegue até o segundo bloqueio meiótico, na metáfase II, quando ocorre a expulsão do primeiro corpúsculo polar, sendo que este permanece até a fecundação (Mayes e Sirard, 2001). Credita-se ao LH a perda de funcionalidade das *gap-junctions* entre as células do cumulus e o oócito, e tal evento levaria a uma diminuição da concentração de AMPc permitindo a retomada da primeira divisão meiótica. Entre outros eventos, é bem estabelecida uma complexa cascata de fosforilação e desfosforilação do fator promotor de maturação (MPF), responsável pela retomada da meiose. O MPF é um complexo formado por ciclina B, subunidade regulatória, e p34 (cdc2) kinase, subunidade catalítica. Este fator é capaz de fosforilar proteínas que formam o envelope nuclear e aquelas envolvidas na condensação da cromatina e reorganização do citoesqueleto (van den HURK e ZAO 2005).

2.2- Maturação *in vitro* de complexos cumulus-oócito bovinos

Newcomb *et al.* (1978) relataram o nascimento de bezerros após fertilização *in vivo* de oócitos removidos de folículos e maturados *in vitro*. Desde então, os estudos sobre a competência de CCOs para MIV avançaram sobremaneira e atualmente é possível o nascimento de bezerros saudáveis não só maturando e fertilizando oócitos *in vitro*, mas também cultivando os embriões nas mesmas condições. Entretanto, na PIV de embriões, o percentual de CCOs maturados *in vitro* que alcança o estágio de blastocisto variam entre 30-40% (Camargo *et al.*, 2006).

A maturação nuclear (MN) dos oócitos é retomada em resposta a gonadotrofinas *in vivo* ou quando são aspirados do interior de folículos para os procedimentos *in vitro*. A MN envolve a ruptura da vesícula germinativa (RVG) e a seqüência de etapas que completam a meiose I (MI) até ocorrer à exclusão de 2º corpúsculo polar, atingindo a metáfase II (MII). O FPM (Fator promotor de maturação) é um dos principais reguladores das alterações morfológicas que ocorrem durante a maturação do oócito, regulando a condensação dos cromossomos, o RVG e a reorganização dos microtúbulos (Kim *et al.*, 2000).

Segundo Khatir *et al.* (1998) após oito horas de MIV o RVG já ocorreu em praticamente todos os ovócitos e em 24 horas, cerca de 90% dos ovócitos de fêmeas bovinas adultas concluíram a meiose I e param em MII. De Loos *et al.* (1992) ao compararem a MIV com a maturação *in vivo*, observaram que a maioria dos oócitos mostrou a mesma taxa de maturação nuclear que aqueles maturados *in vivo*.

De acordo com o supracitado, não seria a maturação nuclear *in vitro* a responsável pelos limitados resultados na produção de embriões. As taxas de maturação, fertilização e clivagem entre oócitos maturados *in vivo* e *in vitro* não apresentam diferença (Sirard e Blondin, 1996). De fato, Rizos *et al.* (2002) não encontraram diferença entre as taxas de clivagem de ovócitos MIV ou maturados *in*

vivo. No entanto, a competência citoplasmática entre esses dois grupos de oócitos é diferente, visto que, oócitos maturados *in vitro* apresentam variações no grau de expansão das células do *cumulus* e incorreta distribuição de organelas (De Loos et al., 1992).

Encontrar o meio de cultivo e a condição de ambiente adequado que torne o oócito competente para a produção de embriões após sua retirada do folículo tem sido um grande desafio até os dias atuais.

Os meios de MIV de oócitos empregados atualmente se dividem basicamente em simples e complexos. Meios simples são constituídos de sais fisiológicos, piruvato, lactato, glicose e solução tamponante a base de bicarbonato. Estes meios podem variar quanto à concentração de íons e níveis das fontes de energia. Além disso, são suplementados com soro ou albumina e traços de antibióticos. Os meios complexos contêm os componentes básicos dos meios simples mais aminoácidos, vitaminas, purinas e outras substâncias encontradas no soro sanguíneo (Gordon 2003). Utilizando-se HEPES ou bicarbonato como substâncias tamponantes, suplementos com diversas fontes de soro e/ou gonadotrofinas e esteróides, o meio complexo TCM199® (*Tissue culture medium 199*) tem sido o mais utilizado em estudos de MIV de oócitos bovinos. De fato, Lonergan *et al.* (1994) demonstraram que o TCM199® foi capaz de promover a maturação de CCOs bovinos mesmo na ausência de soro.

Com relação ao ambiente adequado, duas condições atmosféricas para os sistemas de MIV de CCOs tem sido as mais empregadas e avaliadas. Pinyopummintr e Bavister (1994) concluíram que baixa concentração de oxigênio foi deletéria a MIV e a condição ótima foi de 5% de CO₂ e 20% de O₂. Por outro lado, Miller e Rorie (2000) reduziram o oxigênio atmosférico para 5% e verificaram

aumento da competência do desenvolvimento dos oócitos. Estudo recente de Pereira e colaboradores (2010) aponta que a condição atmosférica ideal está fortemente relacionada ao meio de MIV utilizado. A presença do soro nos meios de MIV em alta concentração de O₂ protege os oócitos dos radicais livres formados.

2.3-Uso do soro na maturação *in vitro* de oócitos

In vivo, logo após o pico pré-ovulatório de LH os oócitos retomam a meiose atingindo a maturação nuclear e citoplasmática. O objetivo da maturação final do oócito é que este se torne equipado com os componentes necessários para o sucesso da fertilização e desenvolvimento inicial do embrião (HYTTEL *et al.*, 1997). Correto número e disposição de mitocôndrias, grânulos corticais e demais organelas, além de estoques suficientes de RNAs e proteínas envolvidas na complexidade de eventos que se passam no interior do gameta feminino irão conferir ao mesmo, competência citoplasmática e nuclear. Entretanto na PIV de embriões, os CCOs são obtidos de folículos de diâmetro entre 3-8 mm em laboratório e em aspirações guiadas por ultra-som praticamente todos os folículos são aspirados. Tais oócitos não apresentam condições ideais para a fertilização *in vitro* e posterior desenvolvimento embrionário (Hendriksen *et al* 2000). Dessa forma, é importante buscar condições de MIV que se assemelhem o máximo possível ao ambiente folicular, especialmente na concentração e razão entre os diversos hormônios e fatores encontrados nas etapas de maturação nuclear e citoplasmática.

É prática comum entre os laboratórios de PIV de embriões (comerciais ou científicos) a inclusão, nos meios de MIV, de macromoléculas de diferentes fontes. O soro sanguíneo bovino, a BSA (Albumina Sérica Bovina) e substâncias sintéticas tais como PVA (Álcool polivinílico) e PVP (Polivinilpirrolidona), são usualmente utilizados

com este propósito (Ali e Sirard 2002; Mingoti et al 2011; Vireque et al 2009). Dentre estes, o soro tem tido maior aceitação. Russell *et al.* (2006) observaram que, comparado a adição de BSA o uso de soro na MIV de CCOs bovinos em TCM-119, proporciona maior expansão de células do cumulus e os embriões produzidos se apresentam morfológicamente melhores e com maior número de células. Corroborando este trabalho Sagirkaya *et al.* (2007) verificaram que a substituição do soro de neonato por formulação sintética de soro mais definida na MIV, produziu taxas de blastocisto semelhantes, porém embriões com menor número de células. Somente quando da adição de EGF (*Epidermal Growth Factor*) no soro sintético, a qualidade embrionária foi semelhante comparado ao soro de neonato. Pereira et al., (2010) obtiveram maiores taxas de blastocistos e estes com maior número de células quando CCOs foram maturados em TCM199® suplementado por soro de vaca em estro comparado a suplementação com PVA.

Apesar dos benefícios que o soro proporciona aos meios de cultivo, sua aplicação traz alguns aspectos negativos. A composição e razão dos constituintes do soro são variáveis (Price e Gregory, 1982), sendo o meio de cultivo suplementado por soro classificado como quimicamente não definido. Tal condição impede que a real necessidade do gameta feminino seja determinada. Além disso, existe diferença entre partidas de soro utilizadas, o que pode provocar variações inesperadas aos resultados (Bavister, 1995). Não obstante, o soro é fonte potencial de contaminantes microbiológicos como fungos, bactérias, vírus ou prions (Gstraunthaler, 2003).

Neste âmbito, é necessária a busca por meios de cultivo quimicamente definidos, a fim de se padronizar os meios e eliminar os efeitos negativos causados

pela adição de soro. De fato, a avaliação de meios de MIV e cultivo *in vitro* (CIV) de embriões em condições mais definidas de cultivo vem crescendo ao longo dos anos.

2.4-Meio Alpha-MEM na maturação *in vitro* de oócitos

Na tentativa de se conhecer melhor as necessidades do oócito como também sua resposta a um ambiente artificial durante a maturação, os meios quimicamente definidos (livres de soro) tem se mostrado de grande utilidade.

O meio Alpha-MEM é a incorporação de aminoácidos não essenciais, piruvato de sódio, ácido lipóico, ácido ascórbico, biotina e vitamina B12 ao meio MEM. Foi testado pela primeira vez para a MIV sendo comparado a outros sete meios de cultura diferentes. Em quatro desses meios, nos quais o Alpha-MEM foi utilizado como diluente, os resultados foram semelhantes ao controle (TCM-199) (Rose e Bavister, 1992). O Alpha-MEM suplementado com fatores de crescimento e macromoléculas sintéticas utilizado para maturação de oócitos bovinos apresenta taxas de blastocisto e blastocisto eclodido semelhantes ao meio TCM-199 suplementado por soro. Além disso, os blastocistos não apresentam alteração na expressão de genes relacionados ao estresse celular (Vireque *et al.*, 2009).

No CIV o meio Alpha MEM também apresenta aplicabilidade. No cultivo de embriões murinos, o meio Alpha-MEM se mostrou eficiente ao apresentar maior numero de blastômeros em blastocistos e aumento nas taxas de eclosão comparado ao meio Ham's F10 (Roudebush *et al.*, 1994). Embriões humanos inviáveis para a transferência ou congelamento foram cultivados em meio Alpha-MEM e atingiram o estágio de blastocisto em maior percentual do que o meio sintético HFT[®] (*synthetic human tubal fluid*) (Lopata e Hay, 1989).

Nosso grupo de pesquisa vem testando a influência deste meio de cultura, associado ou não a células somáticas do folículo ovariano na MIV de CCOs bovinos. Inicialmente, o Alpha-MEM suplementado por macromoléculas sintéticas PVA, fator de crescimento IGF-1 (fator de crescimento semelhante a insulina) e insulina, androstenediona, aminoácidos não essenciais, transferrina, selênio e substâncias tamponantes foi testado para o cocultivo (CCO + células da granulosa) ou cultivo de CCO isoladamente. Esta combinação de suplementos em meio Alpha-MEM na MIV de CCO isolados promoveu uma progressão mais lenta do ciclo meiótico comparado ao meio não definido (TCM199 + soro +FSH). No entanto ao término do período de 24h de MIV as taxas de maturação nuclear não diferiram (Vireque, 2003).

Mais recentemente, na MIV de CCO bovinos, Oliveira e Silva *et al.* (2010) observaram que o meio Alpha-MEM suplementado com os mesmos elementos e mesmas concentrações, promoveu forte inibição da maturação nuclear ao término de 24h. Ao mesmo tempo, ao longo da 24h de cultivo, análises de microscopia eletrônica apontaram sinais de progressão de maturação citoplasmática. O cultivo adicional de 24h em meio TCM199 acrescido de soro e FSH foi capaz de reverter o bloqueio meiótico em cerca de 80% dos oócitos. Apesar dos resultados conflitantes quanto a capacidade de maturação nuclear do meio durante 24h de MIV, a progressão mais lenta da meiose no primeiro trabalho (Vireque, 2003) e os indicativos de maturação citoplasmática no segundo (Oliveira e Silva *et al.*, 2010), apontam a possibilidade de uma sincronia mais eficiente entre a maturação nuclear e a citoplasmática quando do uso do Alpha-MEM e seus suplementos. Dessa forma obtivemos em nosso laboratório resultados de capital importância, uma vez que desenvolvemos um sistema de pré-maturação em meio definido, que é capaz de bloquear a retomada da meiose dos CCOs, na ausência de inibidores sintéticos. Tal

bloqueio é completamente reversível e o cultivo de oócitos neste meio definido promove uma aceleração da maturação citoplasmática.

Segundo Vasconcelos (2008) o cultivo de células somáticas da parede do folículo em meio Alpha-MEM (+ suplementos) acrescido ou não de FSH, induz a manutenção da esteroidogênese das células foliculares, menor secreção de progesterona e parece possuir efeito estimulante da enzima P450aromatase, situação observada em um folículo dominante. Portanto, mimetizando fisiologicamente o folículo em crescimento, este sistema de cultivo, incluindo a formulação do meio de cultura (denominado Alpha-MEMC) são objetos de uma patente depositada pelo nosso laboratório da UnB junto ao INPI (Rosa e Silva *et al* 2008).

Com os resultados de maturação obtidos até o momento, faltava avaliar o potencial de aplicação do meio Alpha-MEMC no sistema completo de PIV de embriões bovinos.

Gulart (2009) cultivou CCOs bovinos durante 24h em meio Alpha-MEMC suplementado por FSH. Após o cultivo em Alpha-MEMC, os CCOs foram cultivados por mais 24h em meio TCM199 acrescido de soro fetal bovino e FSH visando à reversão do bloqueio. A fertilização *in vitro* desses CCOs não respondeu com produção eficiente de embriões, independente da dose de FSH utilizada no Alpha-MEMC (1 ou 10ng/mL). Quando os CCOs foram maturados por 24h sem o período adicional de reversão, as taxas de clivagem foram semelhantes ao controle assim como a taxa de blastocisto do tratamento Alpha-MEMC suplementado por 10ng/mL de FSH. Por fim, neste mesmo trabalho, foi elaborada uma formulação mais simples do Alpha-MEMC. Desta nova fórmula, foram retirados os hormônios e fatores de crescimento e este foi denominado Alpha-MEMB. Ao testar o Alpha-MEMB na MIV

dos CCOs por 24h, utilizando ou não FSH, verificou-se que as taxas de clivagem e blastocisto deste novo meio definido foram semelhantes ao meio não definido rotineiramente utilizado em laboratórios de PIV de embriões bovinos.

O meio definido Alpha-MEMB se mostrou muito promissor pelo seu baixo custo, facilidade de aquisição e pela semelhança de resultado de produção de embriões comparado ao meio não definido. A partir de então acreditamos que o meio definido Alpha-MEMB se mostrou útil para estudos do efeito de outros fatores de crescimento ou hormônios envolvidos na MIV de CCOs. Além disso, é provável que o meio Alpha-MEMB promova melhor maturação citoplasmática visto que a expansão de células do *cumulus* é menos evidente que no meio não definido, porém com taxas de produção de blastocisto semelhante (Gulart, 2009).

Apesar do TCM199[®] ser o meio base de escolha da maioria dos laboratórios que trabalham com a MIV de oócitos bovinos em meio não definido, os resultados empregando o meio Alpha-MEMB como base para o cultivo quimicamente definido são promissores. Consultando revisões bibliográficas, este é o primeiro trabalho que utiliza o meio Alpha-MEMB como instrumento de estudo de outros fatores ou hormônios que possam interferir na MIV de CCOs bovinos.

2.5-Insulina na maturação *in vitro* de oócitos

A insulina é um hormônio anabólico que é essencial para a manutenção da homeostase de glicose, proliferação e diferenciação celular. A insulina se liga a receptores transmembrana da família das tirosina quinases, as quais são divididas em 4 subclasses (I, II, III e IV). Uma vez ativado pela insulina o receptor se autofosforila se tornando ativo. Em seguida, se liga e fosforila substratos de receptores de insulina (IRS). A fosforilação de tirosina de proteínas IRS, cria sítios

de reconhecimento para moléculas que contem domínio SH2; por exemplo, a Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K) (Sung e Goldfine 1996). A PI3-K é essencial para regulação da mitogênese, diferenciação celular e o transporte de glicose estimulado pela insulina.

O receptor de insulina (IR) e o receptor de IGF1 (IGF1-R) pertencem à subclasse II de receptores tirosina quinase. Apesar da similaridade entre IR e o receptor de IGF-1 (IGF1-R), em condições fisiológicas, IGF1-R é específico para IGF-1. Porém, em altas concentrações (não fisiológicas) a insulina pode ativar o IGF1-R (Andersen *et al.*, 1992; Schäffer, 1994). A ativação do receptor de IGF pode promover a expressão e translocação de transportador de glicose 1 (GLUT-1) de células em cultivo (Wilson *et al.*, 1995). A GLUT-1 (*glucose transporter 1*) foi a primeira isoforma de transportador de glicose transmembrana a ser descrita (Kasahara e Hinkle, 1977).

Amsterdam *et al.* (1988) verificaram que a insulina e o FSH atuam de maneira sinérgica no cultivo *in vitro* de células da granulosa de suínos, por promoverem aumento de formação de *gap junctions*, maior desenvolvimento do retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e complexo de golgi. Em bovinos, a insulina na presença do FSH é capaz de estimular a proliferação e esteroidogênese de células da granulosa de maneira dose dependente (Gutiérrez *et al.*, 1997).

Shimizu *et al.* (2008) mediram a concentração de insulina do fluido folicular de ovários bovinos. Em folículos estrógeno ativos, dominantes estrógeno ativos e pré-ovulatórios foi possível encontrar níveis de insulina variando de 0,4-0,5 ng/mL. Esses achados apontam para a participação da insulina na foliculogênese. Além disso, a importância da insulina parece não se resumir apenas as células da granulosa. Imunohistoquímica realizada em oócitos imaturos de camundongos

demonstraram a presença de receptor para insulina- β (IR- β). A expressão do receptor aumentou por estímulo de FSH e permaneceu elevada ao longo da maturação meiótica (Acevedo *et al.*, 2007).

Ainda não estão bem compreendidos quais os efeitos da insulina no desenvolvimento *in vitro* de oócitos. Ocaña-Quero *et al.* (1998) verificaram que a suplementação de insulina bovina (10 μ g/mL) em meio contendo soro aumentou a porcentagem de maturação nuclear, fertilização e embriões clivados. Acevedo *et al.* (2007) verificaram que a cascata de sinalização da insulina está presente em oócitos e que gonadotrofinas influenciam a expressão de receptores de insulina durante a meiose. Também observaram que a MIV de oócitos em cultivo contendo 5ng/mL de insulina, não causa efeitos deletérios na remodelagem da cromatina na meiose e tão pouco induz erros de condensação. Porém a prolongada exposição (10 dias) a elevados níveis de insulina (5 μ g/mL) durante o crescimento do oócito causa inativação da *Glicogen synthase kinase-3* (GSK3) levando a anormal formação de fuso meiótico. Esses resultados corroboram achados prévios de que a inibição de GSK3 causa anormalidade de formação de fuso meiótico e aumenta a incidência de anormal segregação de cromossomos homólogos durante a meiose em camundongos (Wang *et al.*, 2003) o que certamente comprometeria a fertilização e desenvolvimento embrionário inicial.

Lee *et al.* (2005) encontraram efeitos benéficos da insulina quando adicionada a MIV de oócitos suínos. A adição de 100ng/mL ao meio de maturação dos oócitos foi capaz de aumentar a taxa de formação de blastocistos comparada ao meio livre de insulina. Outro achado importante foi de que a insulina aumentou a quantidade de GSH (Glutathiona) encontrada no interior do oócito ao término da MIV. A GSH é reconhecida como o tiol não protéico principal encontrado em células de mamíferos

que as protege de danos oxidativos (Pastore *et al.*, 2003). A concentração de GSH em oócitos bovinos aumenta durante a maturação (Miyamura *et al.*, 1995) melhorando competência destes para atingirem o estágio de blastocisto (Furnus *et al.*, 1998).

Diante da escassa literatura existente quanto ao papel da insulina na MIV de CCOs e a elaboração do meio definido Alpha-MEMB por nosso laboratório, o qual apresenta bons resultados de produção embrionária, foram avaliados os efeitos da insulina adicionada ao meio Alpha-MEMB na maturação nuclear *in vitro* e no acúmulo de importantes transcritos em oócitos bovinos.

2.6-Análise de transcritos em oócitos

Os genes são as regiões do ácido desoxirribonucléico (DNA) cromossômico que estão envolvidas na produção de proteínas pelas células. A informação nos genes é usada pela célula em duas etapas de transferência de informação: o DNA é transcrito em ácido ribonucléico mensageiro (RNAm), que é então traduzido na seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo (Griffiths *et al.*, 2006). Segundo Fair *et al.* (2007) no mínimo 8000 genes são expressos em oócitos bovinos, destes foi demonstrado que 821 genes foram diferentemente expressos entre oócitos imaturos e maturados *in vitro*. Nos últimos anos, a análise de transcritos através da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real tem fornecido valiosas informações a respeito de diversos processos celulares em oócitos e embriões.

Oócitos de animais de pré-puberes são reconhecidamente menos competentes para o desenvolvimento *in vitro* comparados aqueles de animais adultos (Camargo *et al.*, 2005; Leoni *et al.*, 2007). Leoni *et al.* (2007) verificaram que oócitos de ovinos pré-puberes apresentam menor quantidade relativa na expressão

de 7 transcritos comparado a animais adultos, dentre os quais o transcrito GLUT-1. Concluíram que a menor competência de desenvolvimento de oócitos desta categoria animal esta associada à deficiência de estoque de RNAm durante o crescimento oocitário.

O transcrito fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9) é expresso em ovário bovino, ovino e humano (McGrath *et al.*, 1995) e tem sido relacionado a comunicação paracrina entre o oócito e as células do cumulus (Gilchrist e Thompson, 2007). Inicialmente foi localizado exclusivamente no oócito, porém está presente em todos os estágios do desenvolvimento folicular nessas espécies, assim como após a ovulação e fertilização. Essas observações sugerem papel essencial para a normal foliculogênese, crescimento oocitário, fertilização e até mesmo normal desenvolvimento embrionário.

Outro gene comumente avaliado e relacionado ao estresse oxidativo ou térmico em oócitos e embriões é a proteína do choque térmico (HSP 70.1). Este há muito vem sendo utilizado como avaliação de resposta ao estresse de embriões bovinos produzidos *in vitro* na fase de pré-implantação (Niemann e Wrenzycki, 2000). A proteína HSP 70.1 que protege a célula contra os efeitos do estresse foi muito bem caracterizada em oócitos e embriões em trabalho realizado por Kawarsky e King (2001). Esses autores demonstraram a presença da proteína no citoplasma de oócitos maturados sob condições normais e esta se encontrava em associação com o fuso meiótico de oócitos maturados *in vitro*, indicando possível papel na estabilidade desta estrutura. Tanto que maior competência de desenvolvimento é encontrada em oócitos maturados *in vivo* quando coletados próximos ao momento pré-ovulatório e estes apresentam mais baixo padrão de expressão de HSP 70.1 (Humblot *et al.*, 2005). O transcrito PRDX1 (Peroxirredoxina 1) também apresenta

ação antioxidativa e está presente no citoplasma de oócitos e embriões (Leyens *et al.*, 2004). Pertence a uma família de seis membros de peroxidases que atuam principalmente na decomposição de H₂O₂ produzidos nas células (Neumann *et al.*, 2003).

3-OBJETIVOS

3.1-Objetivo geral

Verificar o efeito de concentrações crescentes de insulina em meio quimicamente definido utilizando o meio Alpha MEMB na maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

3.2- Objetivos específicos

- 1- Avaliação da taxa de maturação nuclear de oócitos bovinos;
- 2- Avaliação da expressão dos transcritos GDF9, GLUT1, PRDX1, HSP70.1, após MIV de oócitos bovinos;
- 3- Avaliação de taxas de clivagem e ocorrência de blastocistos bovinos.

4-MATERIAL E MÉTODOS

4.1-Local

As etapas de MIV dos CCO e as análises de maturação nuclear foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução/IB, Universidade de

Brasília, Brasília - DF. A etapa de análises de transcritos em PCR-Real Time foi realizada no laboratório de Reprodução Animal em conjunto com o laboratório de Genética Molecular do Dr. Mário Luiz Martinez, ambos localizados na Embrapa Gado de Leite, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite, Juiz de Fora - MG

4.2-Coleta dos ovários e seleção dos complexos *cumulus*-oócito

Os ovários foram obtidos de fêmeas bovinas mestiças abatidas em frigorífico local e transportados ao laboratório em garrafas térmicas, contendo solução fisiológica (0,9% NaCl e 0,1g/L de sulfato de estreptomicina), à temperatura entre 30-32 °C. Os folículos com diâmetro entre 3-8 mm foram aspirados e os oócitos recuperados foram selecionados sob microscópio estereoscópio. Foram utilizados no experimento, apenas complexos *cumulus*-oócito (CCOs) selecionados de acordo com (Viana *et al.*, 2004).

Grau I - CCOs compacto, mais de três camadas de células do cumulus e oócito com citoplasma homogêneo.

Grau II - CCOs compacto com três ou menos camadas de células do cumulus ou oócito com citoplasma levemente heterogêneo.

Grau III- oócitos parcialmente desnudos, mostrando remoção de células do cumulus em menos de 1/3 da superfície da zona pelúcida.

Grau IV- desnudo e/ou degenerado, oócitos sem células do cumulus na maior parte da superfície da zona pelúcida e/ ou vacuolização e encolhimento do citoplasma.

Cumulus expandido - CCOs mostrando expansão das células do cumulus.

Foi utilizado no trabalho apenas CCOs classificados como grau I e II.

4.3-Maturação *in vitro*

Os CCOs selecionados foram distribuídos aleatoriamente entre os cinco tratamentos de MIV descritos abaixo.

T1 (controle): TCM199 + 10% SFB (soro fetal bovino)

T2: Alpha-MEMB (A-MEM i0)

T3: Alpha-MEMB + 1ng/mL insulina bovina (A-MEM i1)

T4: Alpha-MEMB + 10ng/mL insulina bovina (A-MEM i10)

T5: Alpha-MEMB + 100ng/mL insulina bovina (A-MEM i100)

O meio Alpha-MEM (Invitrogen-Gibco/BRL) foi suplementado por PVA, aminoácidos não essenciais, 10ng/mL de FSH, 5µg/mL de transferrina, 1,4ng/mL de selênio, Hepes e antibióticos (penicilina/estreptomicina). O meio TCM199 foi suplementado por 10% de SFB, 20µg/mL de FSH, 49,9µg/mL de piruvato de sódio, bicarbonato de sódio e antibióticos (penicilina/estreptomicina).

A maturação foi realizada em estufa incubadora a 38,5 °C, com 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade, por 24 horas.

4.4- Fecundação *in vitro* dos CCOs

Após a maturação, os CCOs foram fecundados *in vitro* com sêmen obtido de central de inseminação e testado na PIV de embriões. As palhetas contendo sêmen foram descongeladas em banho- maria a 37 °C por 30 segundos. Para preparação dos espermatozóides foi utilizado o método de gradiente de Percoll (gradiente de densidade 45-90%). A fecundação foi realizada em gotas, sob óleo mineral, de 70 µL em meio FERT-TALP (Gordon, 1994) acrescido de penicilamina, hipotaurina, epinefrina, heparina e com 1×10^6 espermatozóides/mL, por um período de no máximo 22 horas nas mesmas condições de maturação. Em cada gota de fertilização foram alocados de 25 a 30 CCOs de cada grupo de MIV avaliado.

4.5- Cultivo *in vitro* dos embriões

Os possíveis zigotos foram transferidos para o meio CR2aa (Wilkinson et al., 1996) acrescido de 10% de soro fetal bovino em gotas de 50µL sob óleo mineral, onde foram co-cultivados com células da granulosa nas mesmas condições de fecundação. Após 48 horas do início do cultivo, 50% do meio foi renovado e a taxa de clivagem avaliada. No oitavo dia foi avaliada a taxa de blastocisto. As taxas de clivagem e blastocisto foram avaliadas em função do total de CCOs submetidos à maturação *in vitro*. Os resultados de PIV foram analisados a partir de dados obtidos de sete repetições.

4.6-Avaliação da taxa de maturação nuclear

Ao término da maturação *in vitro*, os CCOs de cada tratamento foram desnudados em meio tampão fosfato-salino (PBS) suplementado por BSA, fixados em solução de etanol: ácido acético, 3:1 e posteriormente corados com lacmóide a 1% após fixação em lâmina. A avaliação foi feita utilizando microscópio de contraste de fase em 400x e 1000x. Os oócitos foram classificados de acordo com os estágios da meiose em: imaturos (vesícula germinativa e vesícula germinativa rompida) intermediários (Metáfase I à Telófase I) e maduros (Metáfase II) (Oliveira e Silva *et al.*, 2010). O aspecto de expansão das células do *cumulus* foi relatado, porém não avaliado estatisticamente.

4.7-Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

Após a MIV três *pools* de 10 oócitos de cada tratamento tiveram suas células do cumulus removidas por sucessivas pipetagens em meio PBS suplementado por PVA e congelados por imersão dos criotubos em nitrogênio líquido. As amostras foram estocadas em freezer a temperatura de -80°C até extração do RNA total.

A extração do RNA foi realizada utilizando-se o kit comercial *RNeasy Micro kit* (Qiagen™, Hilden, Alemanha). A lise dos oócitos foi feita com tampão RLT acrescido de 10% de β-Mercaptoetanol (β-ME; Gibco Brl Life Technologies™, Nova York, EUA) (figura 1a). O lisado foi homogeneizado, acrescido de etanol a 70% e transferido para uma coluna de obtenção do RNA. Para lavagem foi adicionado tampão RW1, e posteriormente foi realizada a incubação com solução de DNase por 15 minutos. Após este período ocorreu novamente à lavagem com o tampão RW1 e com o tampão RPE. Em seguida, foi feita a adição de etanol a 80% na coluna e centrifugação para secar a membrana onde estava contido o RNA. Para eluição, foram utilizados 12 µL de água RNase-free, gerando um volume final de aproximadamente 11 µL (~55 ng). A transcrição reversa foi obtida com o kit comercial *SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix* (Invitrogen™, Califórnia, EUA). Brevemente, 5 µL (~30ng) de RNA foram utilizados em cada reação de síntese de cDNA. Uma reação contendo RNA, *primer* oligo dT, tampão de pareamento e água livre de RNase/DNase foi incubada por 5 minutos a 65°C. Em seguida, 12 µL de um *mix* (2X *First-Strand reaction mix* e *SuperScript III RNaseOUT Enzyme mix*) foi adicionado à reação e esta foi incubada a 50°C por 50 minutos, seguido de 85°C por 5 minutos. O volume final foi de 20 µL (~14.000 ng) de cDNA por reação. Após a extração e transcrição reversa, 1 µL do RNA e cDNA de cada amostra foram avaliados em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000, Wilmington™, EUA), para análise da concentração e pureza do material (figura 1b). O cDNA de

cada grupo experimental permaneceu estocado em freezer a -80°C até posterior utilização.

4.8-PCR em tempo real

Para maior eficiência nas reações de PCR em tempo real, as quantidades dos primers (GDF9, GLUT1, PRDX1, HSP70, GAPDH e β -Actina) e de cDNA foram previamente padronizadas. Após padronização, foram feitas reações com o kit comercial *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A reação contendo cDNA, par de *primers*, *Master Mix* (dNTPs, referência passiva-ROX, *SYBER Green*) e 0,1 U de Taq DNA Polimerase, em um volume final de 25 μ L, foi incubada a 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos, temperatura de pareamento específica para cada *primer* (tabela 1) por 30 segundos e extensão a 60°C por 30 segundos. Controles negativos foram preparados em que o cDNA foi omitido durante a reação. Foram feitas reações em triplicata para cada amostra (de todos os grupos) das respectivas repetições em placas ópticas de reação de 96 poços (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (figuras 1c e 1d).

A quantificação relativa foi realizada utilizando-se o método do Cycle Threshold (CT) comparativo, com os resultados expressos em relação a genes de referência endógena e um grupo calibrador (grupo controle). Os genes de referência endógena foram GAPDH e β -Actina, pois estes genes são utilizados em vários trabalhos de expressão gênica em oócitos bovinos (Mourot *et al.*, 2006; Sagirkaya *et al.*, 2007) e têm fornecido bons resultados por apresentar pouca variação nos níveis de mRNA durante a MIV (Bettegowda *et al.*, 2006). Como grupo calibrador foi

utilizado o sistema de maturação A-MEMi0. As figuras 2, 3 e 4 demonstram as curvas de dissociação dos genes analisados.

4.9-Análise estatística

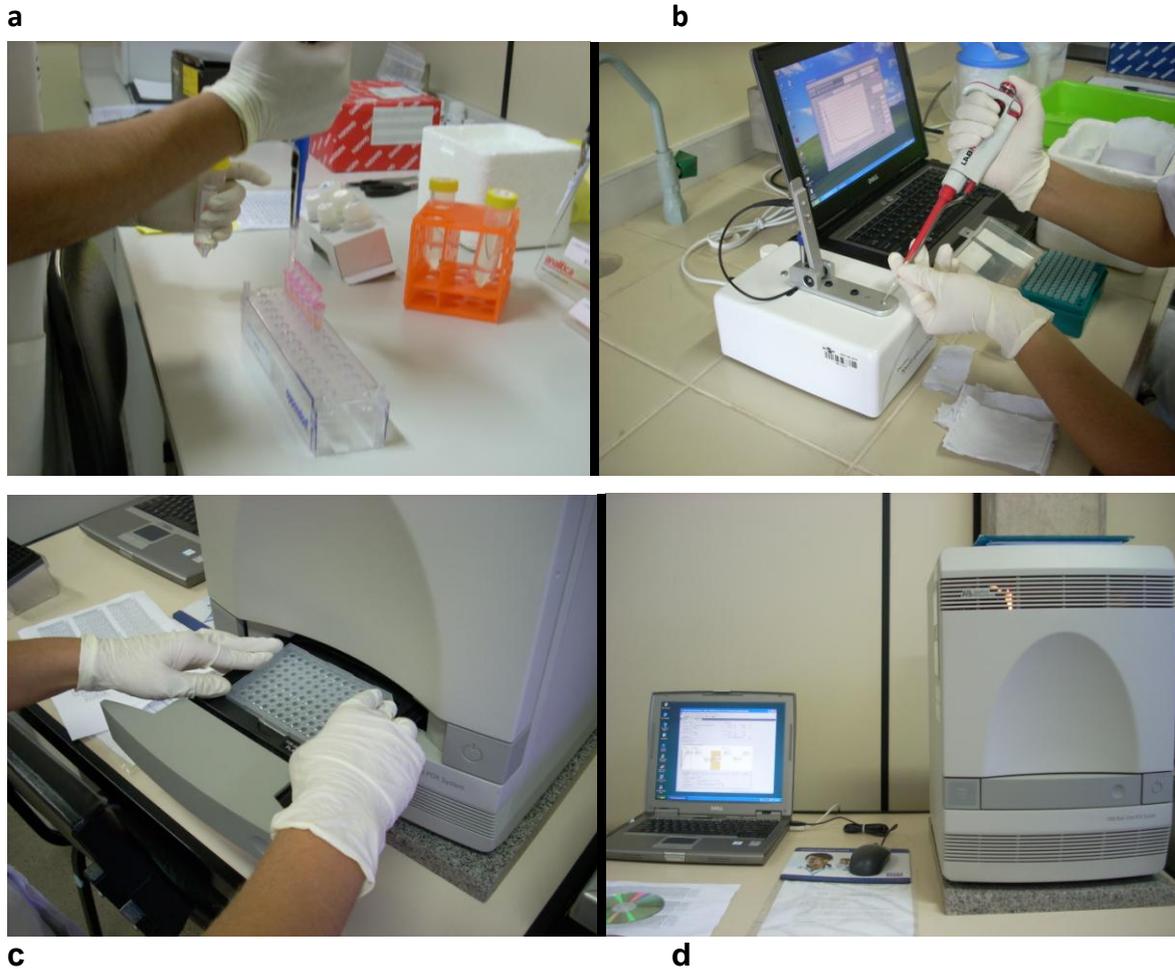
Para a análise da quantificação relativa dos genes foi utilizado o programa *Relative Expression Software Tool*(REST®) que possui o modelo estatístico *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation TEST*® (versão 384 - Beta, 2005) o qual foi utilizado para analisar os dados obtidos da quantificação relativa da PCR em tempo real. Esse modelo foi desenvolvido com base em testes de permutação, que é uma alternativa a ser utilizada quando testes paramétricos não podem ser usados. Esses testes obtêm resultados a partir de permutações aleatórias dos dados do experimento. Para análise da quantificação relativa utilizou-se como referência endógena o gene da β -Actina, cujo coeficiente de variação entre as amostras foi menor quando comparado com o GAPDH.

Diferenças nas taxas de maturação nuclear foram avaliadas pelo teste do Qui-quadrado com nível de significância de 5%.

Tabela1- Sequência dos *primers* específicos, temperaturas de pareamento, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no GeneBank

Produto	Sequência do <i>primer</i>	Temp. pareamento	Tamanho do produto	Nº de acesso GeneBank/Ref
GDF9	F 5'GACCCCTAAATCCAACAGAA3' R 5'AGCAGATCCACTGATGGAA3	53°C	120pb	NM_174681
GLUT1	F 5' -CCAAGGATCTCTCAGAGCACAG- 3' R 5' -TTCTTCTGGACATCACTGCTGG- 3'	53°C	110pb	(Sagirkaya <i>et al.</i> , 2007)
PRDX1	F 5'ATGCCAGATGGTCAGTTCAAG3' R 5'CCTTGTTTCTTGGGTGTGTTG3	53°C	224pb	(Mourot <i>et al.</i> , 2006)
HSP70	F 5'AACAAGATCACCATCACCAACG3' R 5'TCCTTCTCCGCAAGGTGTTG3'	59°C	275pb	NM 174550
β -Actina	F 5'GACATCCGCAAGGACCTCTA3' R 5'ACATCTGCTGGAAGGTGGAC3'	53°C	205pb	NM_173979
GAPDH	F 5'CCAACGTGTCTGTTGTGGATCTGA3' R 5'GAGCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG3'	53°C	237pb	(Mourot <i>et al.</i> , 2006)

Figura1- Etapas de extração de transcritos e reação de PCR.



1-Etapa de extração do RNA.

2- Análise de concentração e pureza de RNA e cDNA em aparelho Nanodrop ND-1000, Wilmington, EUA.

3- Colocação da placa óptica de reação de 96 poços contendo cDNA para leitura em aparelho de PCR em tempo real.

4- Aparelho 7300 Real Time PCR system, Applied Biosystems.

Figura 2: Curvas de dissociação dos genes GDF9 (A) e GLUT1 (B) obtidas após amplificação do PCR em tempo real.

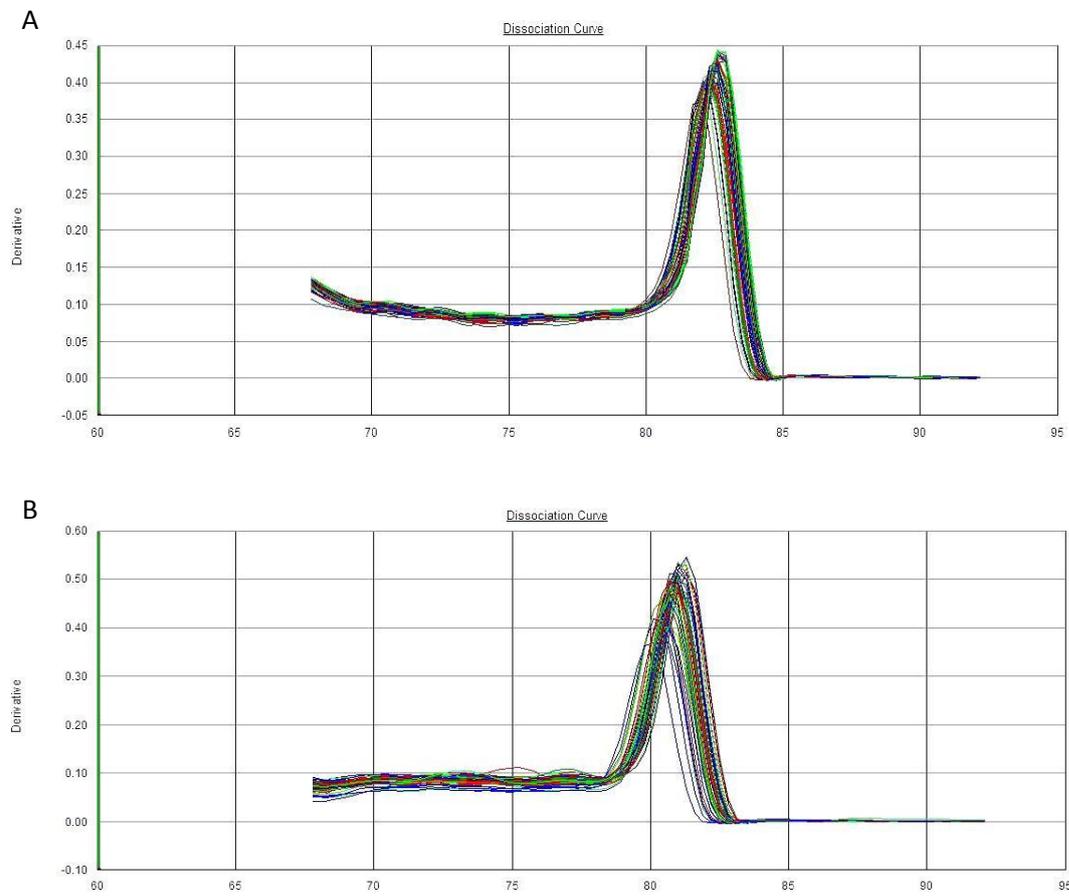


Figura 3: Curvas de dissociação dos genes, PRDX1 (C), HSP 70.1 (D) obtidas após amplificação do PCR em tempo real.

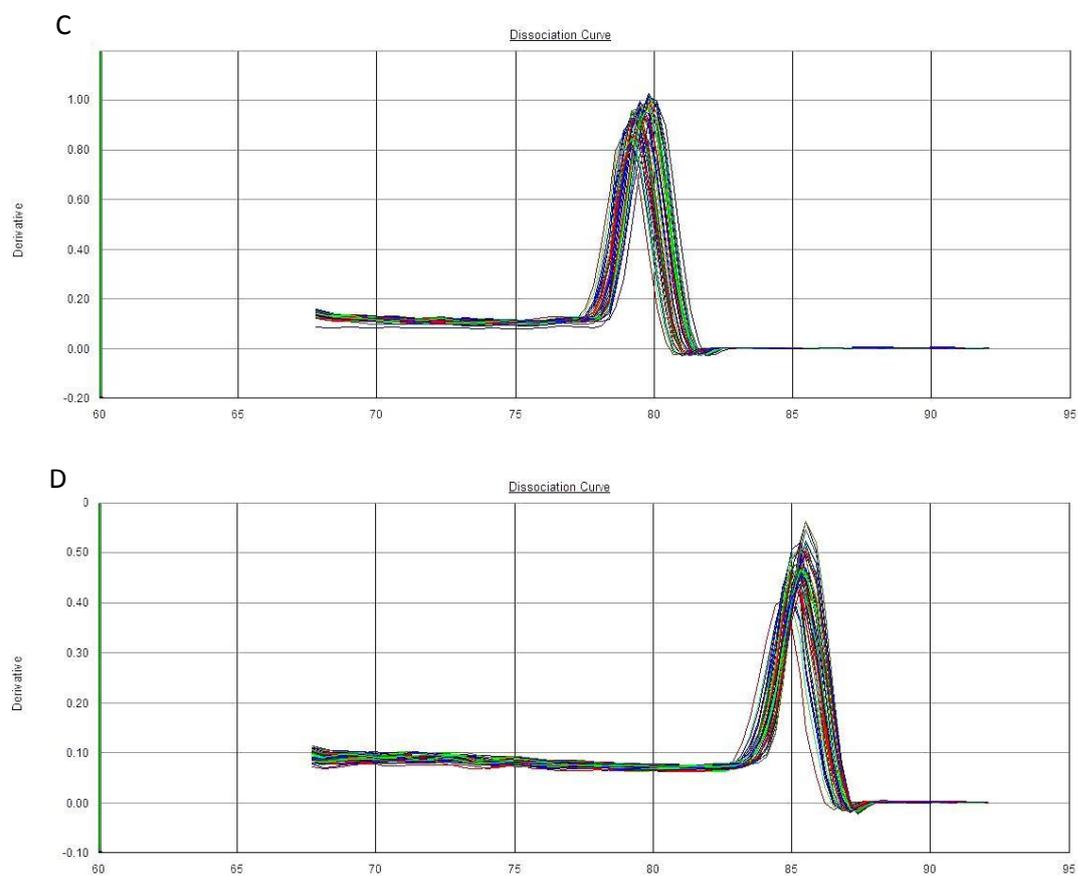
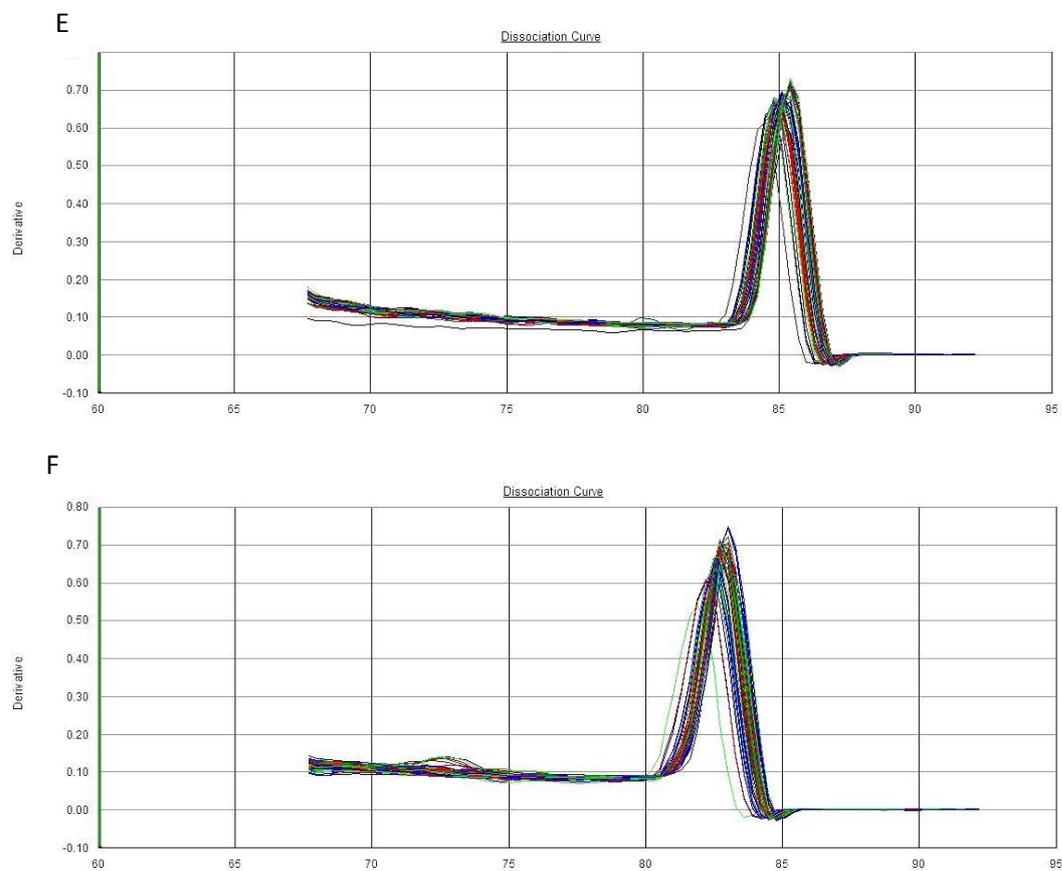


Figura 4: Curvas de dissociação dos genes β -Actina (E), GAPDH (F) obtidas após amplificação do PCR em tempo real.



5-RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1-Avaliação da taxa de maturação nuclear de oócitos maturados em meio definido contendo diferentes concentrações de insulina

O estudo avaliou a taxa de maturação nuclear em oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio Alpha-MEMB definido acrescido de diferentes doses de insulina.

Os dados referentes à taxa de maturação foram avaliados em 305 oócitos e encontram-se dispostos na Figura 5. Não houve diferença entre os tratamentos para oócitos encontrados no estágio intermediário (metáfase I à telófase I) ao término das 24h de MIV. Porém, o tratamento controle apresentou menor ($p < 0,05$) percentual (4,2%) de oócitos imaturos que os demais tratamentos (A-MEM i0=26,22%, A-MEM i1=25,37%, A-MEM i10=18,86%, A-MEM i100= 22,95%), assim como maior ($p < 0,05$) taxa de oócitos em Metáfase II (MII) (74,3%) que os tratamentos A-MEM i0=50,3%, A-MEM i1=53,7%, A-MEM i10=47,2%. No entanto, o tratamento A-MEM i100 apresentou percentual de oócitos em MII (60,7%) semelhante ($p > 0,05$) ao tratamento controle e também semelhante aos demais tratamentos em meio quimicamente definido.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que a taxa de maturação nuclear de oócitos maturados em meio Alpha MEMB + 100ng/mL de insulina foi similar ao grupo controle (meio contendo soro). Em geral, 70-80% dos CCOs bovinos submetidos aos sistemas de maturação *in vitro* atuais, atingem o estágio de MII da meiose (ALM et al., 2005; DODE e ADONA et al., 2001). Porém, o meio Alpha-MEMB livre de insulina ou acrescido das doses de 1 e 10 ng/mL apresentou menores taxas de oócitos maduros ao término da MIV. Testando a combinação insulina-transferrina-selenio (ITS) na MIV de CCOs de fêmeas bovinas pré-púberes,

Córdova et al (2010) encontraram taxa de maturação nuclear de 76,9% ao término de 24h, valores similares ao encontrado neste trabalho (74,3%).

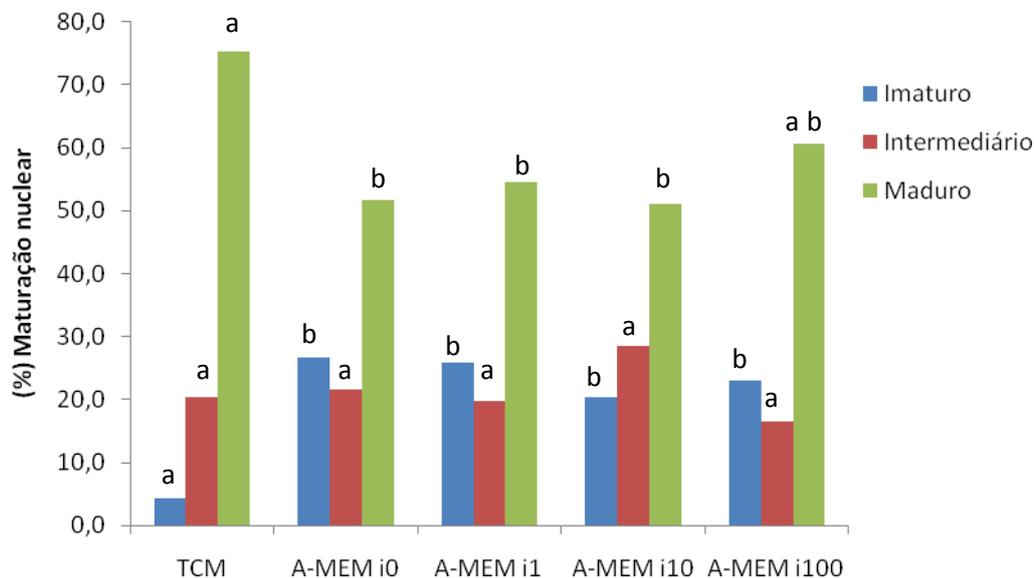


Figura 5- Efeito da insulina nas taxas de maturação nuclear de oócitos (n=305) maturados em meio definido por 24h. ^{a,b} Letras diferentes entre os tratamentos para cada estágio de maturação nuclear demonstram diferença estatística (P<0.05) pelo teste do Qui-quadrado.

TCM: MIV de 24h em meio TCM199 + 20µg/mL FSH + 10% SFB (n=69); A-MEM i0: MIV de 24h em meio Alpha-MEMB + 10ng/mL FSH (n=60); A-MEM i1: MIV de 24h em meio Alpha-MEMB + 10ng/mL FSH + 1ng/mL insulina (n=66); A-MEM i10: MIV de 24h em meio Alpha-MEMB + 10ng/mL FSH + 10ng/mL insulina (n=49); A-MEM i100: MIV de 24h em meio Alpha-MEMB + 10ng/mL FSH + 100ng/mL insulina (n=61).

Oliveira e Silva *et al.* (2010) avaliaram a maturação nuclear de oócitos maturados em Alpha-MEM acrescido de 100ng/mL de insulina. Os resultados indicaram que mais de 70% dos oócitos permaneceram imaturos ao término de 24 de MIV, indicando que o meio definido induz bloqueio da meiose. Tais resultados são conflitantes com os encontrados neste experimento, o Alpha-MEM acrescido de

100ng/mL de insulina apresentou taxa de maturação nuclear semelhante ao grupo controle (60,7% e 74,3% respectivamente). No entanto, no presente experimento, o FSH foi adicionado ao meio Alpha-MEM, sendo que tal gonadotrofina não foi adicionada no trabalho de Oliveira e Silva *et al.* (2010). O FSH possui papel importante na MIV de oócitos. Ao se ligar a receptores nas células do cumulus, o FSH aumenta os níveis de AMPc que são transmitidos para o oócito através das junções gap (Van den HURK e ZAO 2005). O aumento temporário de AMPc promove a ativação da proteína kinase A II (PKA II) o que resulta na transcrição de genes necessários para o início da maturação (Rodriguez e Farin 2004).

Como já citado, a insulina e o FSH atuam de maneira sinérgica no cultivo *in vitro* de células da granulosa, por promoverem aumento de formação de *gap junctions*, maior desenvolvimento do retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e complexo de golgi (Amsterdam *et al.*, 1988). Além disso, a insulina na presença do FSH é capaz de estimular a proliferação e esteroidogênese de células da granulosa de maneira dose dependente (Gutiérrez *et al.*, 1997). No presente experimento, foi observado que o meio Alpha MEMB acrescido de 100ng/mL de insulina apresentou expansão das células do cumulus de maneira similar ao meio TCM199® + soro (controle). Outra observação importante foi de que o aspecto de expansão das células do cumulus foi dose dependente, ou seja, as doses de 1 e 10 ng/mL de insulina também apresentaram expansão das células.

Vireque (2003) observou que meio Alpha MEM acrescido de fatores de crescimento (IGF-1 e insulina) promoveu uma progressão mais lenta do ciclo meiótico comparado ao meio não definido (TCM199 + soro +FSH). No entanto ao término de 24h de MIV as taxas de maturação nuclear não diferiram do grupo controle. Oliveira e Silva *et al* (2010) verificaram que apesar da inibição da meiose

nas primeiras 24h de MIV os oócitos apresentaram retomada da divisão meiótica, quando estes foram submetidos a adicionais 24h de maturação em meio indefinido. Não obstante, os oócitos que tiveram inibição da meiose nas primeiras 24h de MIV apresentaram características de maturação citoplasmática, tais como: presença de microvilosidades eretas na membrana plasmática, mitocôndrias distribuídas na região cortical do ooplasma, e presença de grânulos corticais alinhados a zona pelúcida.

No presente trabalho, o percentual de oócitos que atingiu o estágio de MII quando os CCOs foram maturados em Alpha MEMB acrescido de 100ng/mL, demonstra que a formulação elaborada sem a presença de soro, é eficaz para a maturação nuclear de oócitos bovinos. Observou-se ainda que o efeito inibitório do meio Alpha MEM na progressão da meiose pode ser revertido quando da adição de 10ng/mL de FSH.

5.2-Quantificação de transcritos armazenados em oócitos bovinos maturados em meio definido contendo diferentes concentrações de insulina

Adotando-se o tratamento A-MEMi0 como normalizador para a comparação somente entre os grupos onde os meios são definidos e contém doses diferentes de insulina, observou-se diferença ($p<0,05$) na quantidade relativa dos transcritos GDF9, PRDX1 e HSP70.1 (Figuras 6 e 7). O transcrito GDF9 apresentou maior ($p<0,05$) quantidade em oócitos maturados em meio A-MEMi0 que os demais tratamentos. O transcrito PRDX1 foi menos expresso em meio A-MEMi10 e A-MEMi100 do que em meio isento de insulina. Padrão similar de expressão de

HSP70.1 nos oócitos também foi encontrado pois em meio A-MEMi1, A-MEMi10 e A-MEMi100, verificou-se menor ($p < 0,05$) abundância de transcritos.

Os níveis de transcritos dos genes analisados foram avaliados nos grupos de maturação de oócitos Alpha MEMB com ou sem insulina. A insulina diminuiu a expressão do transcrito GDF9. O GDF-9 é um membro específico da família fator de crescimento e transformação β (TGF β) presente no oócito que está envolvida na maturação (Thompson *et al.*, 2007; Eppig, 2001). Este fator oocitário parece ser um fator indutor de expansão do cumulus que permite as células da granulosa responderem ao FSH para a produção de ácido hialurônico (Eppig, 2001) e dessa forma está envolvido com a competência dos oócitos para a produção de embriões. De fato, Gilchrist e Thompson, (2007) relataram que a capacidade de maturação *in vitro* de oócitos para a produção de blastocistos pode ser substancialmente aumentada de 40% (controle) para 50% quando o GDF9 recombinado é adicionado ao meio de maturação livre de soro.

Os resultados no presente experimento demonstram que o meio definido suplementado por insulina, desde a menor concentração, produziu menores níveis de GDF9. Tal situação sugere que as células do cumulus são beneficiadas pela adição de insulina, possivelmente por um aumento da quantidade de receptores de FSH e, conseqüentemente, uma menor necessidade de transcrição de GDF9.

Além disso, oócitos maturados *in vitro* são conhecidos por serem menos competentes na produção de embriões quando comparados com oócitos maturados *in vivo* (Camargo *et al.*, 2006) e a abundância de GDF9 mRNAs é também menor em oócitos bovinos maturados *in vivo* (Lonergan e Fair, 2008). Esta diferença de GDF-9 entre os níveis de mRNA *in vitro* e *in vivo* em oócitos maturados pode refletir níveis inadequados dos fatores de crescimento presentes nos oócitos maturados *in vitro*

(Lonergan *et al.*, 2003). Neste estudo, o meio de maturação mais competente para a MIV de CCOs mostrou também menor abundância do transcrito GDF9 no final de maturação, indicando um maior equilíbrio em fatores de maturação quando a insulina é utilizada na suplementação do meio definido Alpha MEMB.

O transcrito GLUT1 está envolvido no metabolismo da glicose. GLUT1 foi o primeiro transportador de glicose a ser descrito e é responsável pelo transporte de glicose através da membrana plasmática (Olso e Pessin 1996). Neste estudo, a presença de insulina no meio definido, não alterou a abundância do transcrito GLUT1.

A análise do transcrito GLUT1 em oócitos e embriões tem sido usada para compreender melhor o processo metabólico nestas estruturas (Lequarré *et al.*, 1997, Lopes *et al.*, 2007). A expressão de mRNA GLUT1 em oócitos bovinos reduz pela metade durante a maturação, talvez por causa da degradação natural de mRNAs durante este período (Lequarré *et al.*, 1997). Wrenzycki e colaboradores (1999) verificaram que a abundância relativa de Glut1 em oócitos maduros não se altera com a fonte de proteína utilizada na MIV, sendo soro de vaca em estro ou PVA. Além disso, os estudos indicam que os oócitos utilizam os substratos do metabolismo da glicose que ocorre nas células do *cumulus* (Sutton *et al.*, 2003), e o metabolismo da glicose é baixo no oócito durante a maturação (Rieger e Loskutoff, 1994). Estes achados sugerem que os níveis de transcritos GLUT1 em oócitos são reduzidos durante a maturação e pouco influenciados pelo meio de maturação utilizado. No presente estudo, não houve diferença nos níveis do transcrito Glut1 em oócitos quando a insulina esteve ou não presente no meio de maturação, corroborando a hipótese de que o meio de MIV possua pouca influência nos níveis de transcrição de GLUT1 em oócitos. No entanto observa-se diminuição dos níveis

de Glut1 à medida que a dose de insulina é aumentada no meio Alpha MEMB. Tal situação pode sugerir também ação da insulina no metabolismo das células do *cumulus* favorecendo adequado transporte de substratos energéticos para o oócito.

É sabido que, nos sistemas de MIV, a alta concentração de oxigênio contribui para o estresse oxidativo uma vez que aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Pereira *et al.*, 2010). Os danos causados por esses radicais livres vão desde a danos na formação do fuso meiótico em oócitos, promovendo baixa taxa de oócitos atingindo MII (Zhang *et al.*, 2006) até indução de apoptose em embriões (Yang *et al.*, 1998). A PRDX1 e a HSP 70.1 têm propriedades antioxidantes em várias células e estão presentes em oócitos bovinos (Christians *et al.*, 2003, Leyens *et al.*, 2004, Pereira *et al.*, 2010) . A PRDX1 pertence a uma família de seis membros das peroxidases que atuam principalmente na decomposição de H₂O₂ produzidos nas células (Leyens *et al.*, 2004; Mourot *et al.*, 2006) e seus níveis de expressão podem auxiliar no estudo da resposta celular ao estresse oxidativo. Já as proteínas do choque térmico (Hsp) podem ser classificadas em dois grupos principais, as formas constitutivas e induzidas. A expressão constitutiva ou induzida de HSP70.1 produz proteínas que auxiliam na manutenção das funções celulares que são expostas a perturbações no microambiente de maturação, como o estresse oxidativo (Al-Katanani e Hansen, 2002; Christians *et al.*, 2003) ou térmico (Camargo *et al.*, 2007).

Neste estudo, 10 e 100 ng / mL de insulina durante a maturação diminuiu a abundância dos transcritos Prdx1 e Hsp 70.1 em oócitos. Além disso, apenas 1 ng / mL de insulina induz a *downregulation* do gene HSP 70.1. Pereira *et al.*, (2010) observaram que, no final de MIV, os oócitos mostraram maiores quantidades de transcrito PRDx1 e HSP 70.1 em meio onde a fonte de proteína foi o soro e não

PVA. O soro foi também melhor na condição de 20%O₂ na MIV respondendo com aumento da produção e qualidade de blastocistos. De fato, o soro tem propriedades antioxidantes em cultivo e pode ajudar a reduzir os efeitos negativos de ROS (Ali et al., 2002, Zhang et al., 2006). Os nossos resultados indicam que a adição de 100 ng/mL de insulina no meio de maturação Alpha MEM definido, que também utiliza PVA como a principal fonte de proteínas, reduziu a quantidade de transcritos relacionados ao stress oxidativo e aumentou a taxa de oócitos que atingiram o estágio de MII.

Tais achados são importantes uma vez que a dose de 10ng/mL de insulina em meio de MIV livre de soro já é suficiente para diminuir a transcrição de genes envolvidos no processo de resposta ao estresse celular. O soro, como já mencionado anteriormente, possui fatores benéficos a oócitos e embriões, tais como aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento, substratos e energéticos, bem como proteção contra radicais livres (Price e Gregory, 1982). No entanto o soro carrega aspectos negativos como contaminantes microbiológicos (Gstraunthaler, 2003) e fatores que alteram a expressão gênica (Lonergan et al 2006). Em virtude dos efeitos do soro, a insulina se mostra útil na constituição de meios definidos de MIV, uma vez que transcritos que denotam estresse celular em cultivo foram menos expressos nos oócitos quando a insulina foi adicionada.

A formulação do meio de MIV neste trabalho, contou ainda com adição de transferrina e selênio. Estes dois elementos apresentam atividade antioxidante em sistemas biológicos (Wu et al 1973; Gutteridge, 1986) e diversos trabalhos tem testado a combinação ITS como suplemento nos sistemas de maturação de oócitos bovinos, suínos e bubalinos livres de soro (Córdova et al 2010; Jeong et al 2008; Raghu et al 2002). O presente estudo aponta que, em bovinos, a insulina na dose de

100ng/mL + 5µg/mL de transferrina e 1,4ng/mL de selênio parece ser a melhor combinação para obtenção de boas taxas de maturação nuclear de oócitos em meio definido assim como *downregulation* da expressão de genes associados ao estresse promovido pelo sistema *in vitro*. Menor quantidade dos transcritos PRDX1 e HSP 70.1 fornece indicativo de que houve menor necessidade da atividade de processos de proteção celular as condições adversas de cultivo durante a MIV.

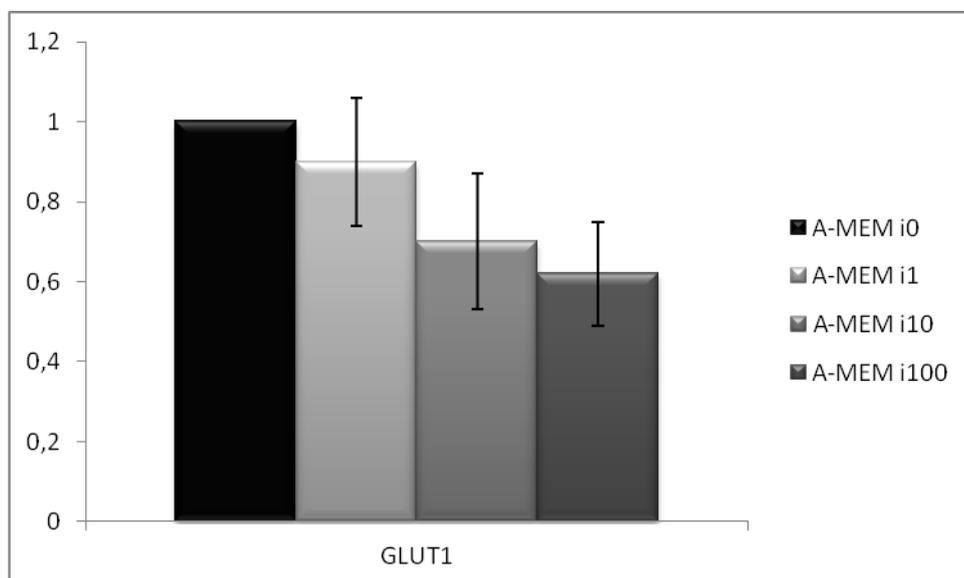
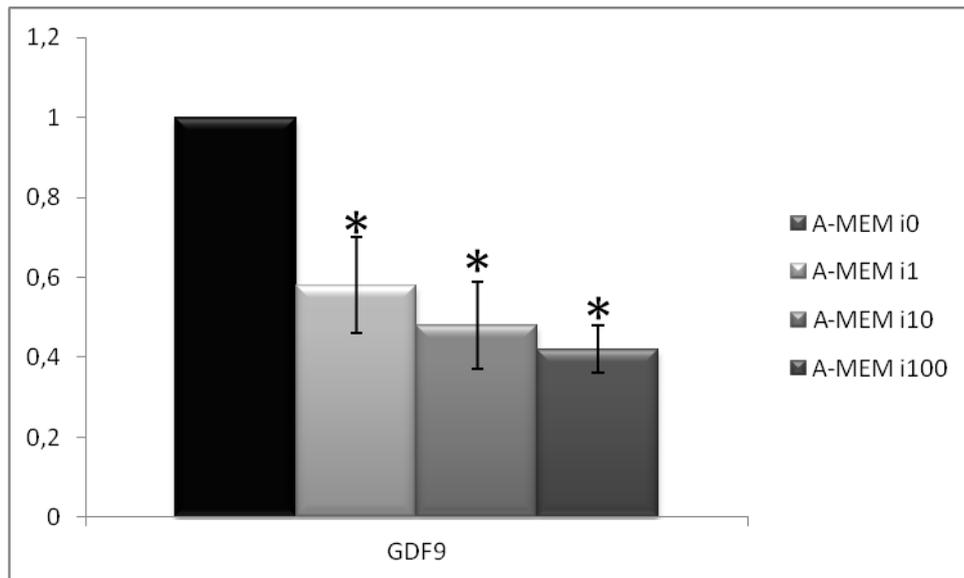


Figura 6: Abundância relativa de transcritos relacionados a maturação (GDF9) e captação de glicose (GLUT1) em oócitos bovinos maturados em meio Alpha-MEMB. Os resultados estão demonstrados em média e erro padrão utilizando-se o meio A-MEMi0 como normalizador (valor igual a 1).* indica diferença ($p < 0.05$) na comparação de A-MEM com 0ng/mL de insulina *versus* A-MEM com 1,10 ou 100ng/mL.

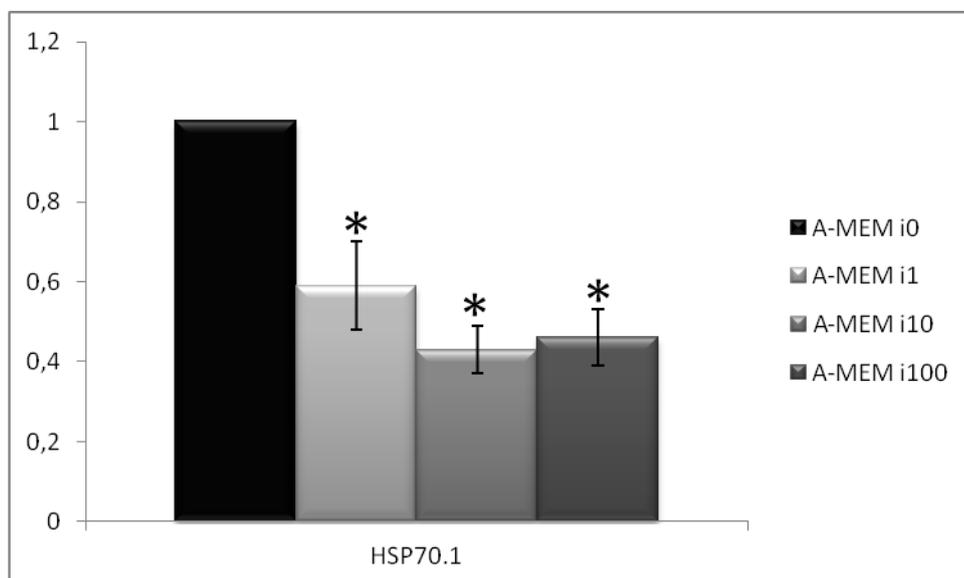
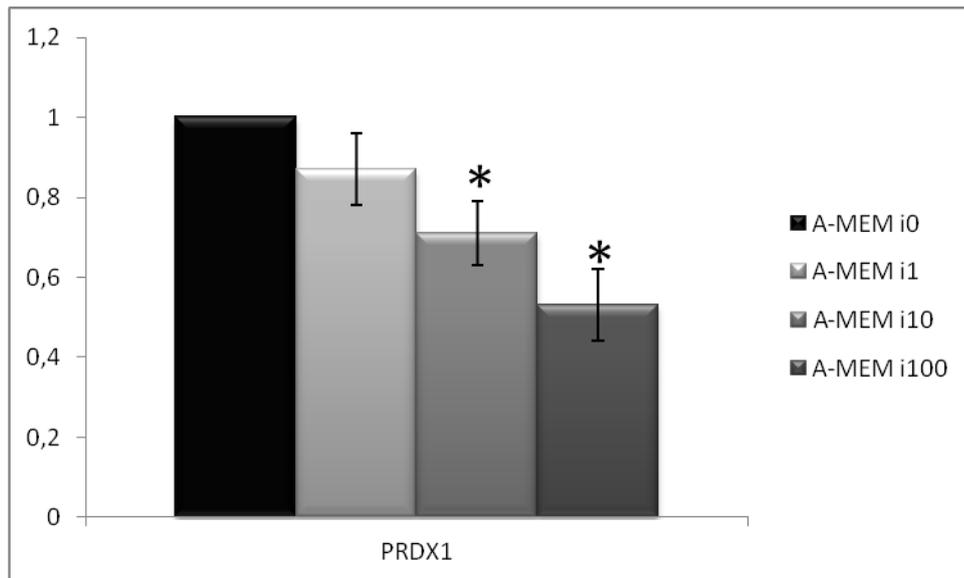


Figura 7: Abundância relativa de transcritos relacionados a estresse celular (PRDX1 e HSP 70.1) em óocitos bovinos maturados em meio Alpha-MEMB. Os resultados estão demonstrados em média e erro padrão utilizando-se o meio A-MEMi0 como normalizador (valor igual a 1).* indica diferença ($p < 0.05$) na comparação de A-MEM com 0ng/mL de insulina *versus* A-MEM com 1,10 ou 100ng/mL.

5.3- Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos maturados em meio definido contendo diferentes concentrações de insulina

Os dados referentes às taxas de clivagem e produção de blastocistos estão dispostos na tabela 2. Foram submetidos à maturação 689 CCOs bovinos em meio Alpha MEMB acrescido de diferentes doses de insulina ou em meio TCM199 + SFB, fecundados e os prováveis zigotos submetidos ao cultivo. No que concerne a taxa de clivagem, não houve diferença ($P > 0,05$) entres os grupos avaliados. A ausência de insulina ou sua presença em diferentes doses não influenciou no percentual de oócitos que apresentaram clivagem de 2 ou mais células 48h após FIV. Diferente de tais achados a suplementação de insulina bovina ($10\mu\text{g/mL}$) em meio de MIV contendo soro aumentou a porcentagem de maturação nuclear, fertilização e embriões clivados em estudo de Ocaña-Quero *et al.* (1998). As taxas de clivagem encontradas no presente estudo, variando entre 57,4 a 67,2%, utilizando o meio Alpha MEMB definido ou o TCM199® + SFB são semelhantes à de outros trabalhos de PIV de embriões (Mota *et al.*, 2009; Vireque *et al.*, 2009).

Vireque *et al.* (2009) encontraram taxas de clivagem de 54,4% ao utilizarem o meio Alpha MEM acrescido de PVA e 100 ng/mL de insulina, mas livre de soro e FSH. No presente estudo, o meio definido Alpha MEMB com FSH e PVA, porém livre de insulina apresentou a menor taxa de clivagem (57,4%), mas semelhante ao trabalho de Vireque *et al.* (2009). A comparação direta com o presente estudo se torna mais adequada ao compararmos o trabalho citado acima com o grupo Alpha MEM + 100ng/mL uma vez que está formulação difere na inclusão de FSH. A inclusão da gonadotrofina promoveu aumento de 8,8% na taxa de clivagem. De fato, o FSH é hormônio chave para a maturação oocitária, sendo de suma importância nas primeiras horas da maturação *in vitro*. Como já mencionado, o FSH estimula o

aumento de AMPc no oócito transmitido das células do cumulus, ativando kinases importantes para a maturação (Rodriguez e Farin, 2004).

Tabela 2: Efeito da insulina em meio definido de MIV de CCOs nas taxas de clivagem e produção de blastocistos bovinos.

Grupo	No.	Clivagem	Blastocisto D8
		n (%)	n (%)
TCM	142	86 (60,6) ^a	37 (26,1) ^{ab}
A-MEM i0	136	78 (57,4) ^a	33 (24,3) ^b
A-MEM i1	141	91 (64,5) ^a	38 (27,0) ^{ab}
A-MEM i10	137	92 (67,2) ^a	36 (26,3) ^{ab}
A-MEM i100	133	84 (63,2) ^a	48 (36,1) ^a

Letras diferentes (a e b) na mesma coluna diferem estatisticamente ($P < 0.05$) pelo teste do qui quadrado.

TCM: MIV de 24h em meio TCM199 + 20 μ g/mL FSH + 10% SFB;

A-MEM i0: Alpha-MEM (Invitrogen-Gibco/BRL) suplementado por PVA, aminoácidos não essenciais, 10ng/mL de FSH, 5 μ g/mL de transferrina, 1,4ng/mL de selênio, Hepes e antibióticos;

A-MEM i1: A-MEM i0 acrescido de 1ng/mL de insulina;

A-MEM i10: A-MEM i0 acrescido de 10 ng/mL de insulina;

A-MEM i100: A-MEM i0 acrescido de 100 ng/mL de insulina.

A utilização do meio Alpha MEM + suplementos na MIV de CCOs pode ser a principio controverso uma vez que Oliveira e Silva (2010) verificaram forte inibição da maturação nuclear ao término de 24h. No entanto, análises de microscopia eletrônica apontaram sinais de progressão de maturação citoplasmática e o cultivo adicional de 24h em meio TCM199 acrescido de soro e FSH foi capaz de reverter o bloqueio meiótico em cerca de 80% dos oócitos. Observou-se no presente estudo que as taxas de maturação (MII) ficaram bem próximas as taxas de clivagem ou por vezes menores. É possível que aqueles oócitos que atingiram a maturação nuclear

encontravam-se com mais adequada competência citoplasmática para a fecundação corroborando o trabalho de Oliveira e Silva (2010).

Estimular a proliferação e esteroidogênese de células da granulosa de maneira dose dependente (Gutiérrez *et al.*, 1997), promover aumento de formação de *gap junctions*, maior desenvolvimento do retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e complexo de golgi são algumas das propriedades que a insulina na presença do FSH, apresenta como atividade nas células do *cumulus* (Amsterdam *et al.*, 1988). Desta forma um adequado crosstalk entre oócito e células do cumulus pode ser também apontado como razão para oócitos que desenvolvam maior competência citoplasmática quando utilizamos Alpha MEMB acrescido de insulina e FSH. Além disso, Lee *et al.* (2005) verificaram que a insulina aumentou a quantidade de GSH (Glutathione) encontrada no interior do oócito ao término da MIV. A concentração aumentada de GSH em oócitos bovinos melhora a competência destes para atingirem o estágio de blastocisto (Furnus *et al.*, 1998).

Considerar taxas de clivagem como parâmetro para competência oocitaria não parece ser muito adequado uma vez que estudo de Alm *et al.* (2005), avaliando a qualidade de CCOs via procedimentos não invasivos, demonstra que oócitos de competência distinta para PIV, apresentam taxas de clivagem semelhantes pós FIV. Além disso, Rizos *et al.* (2002) não encontraram diferença na taxa de clivagem entre oócitos com diferentes competências de desenvolvimento (maturados *in vitro* ou *in vivo*), porém com diferentes taxas de blastocistos. Isso sugere que a competência do oócito interfere na produção de embriões, mesmo sem necessariamente interferir na clivagem.

Os resultados de produção de blastocistos estão dispostos na tabela 2. Observou-se no presente trabalho que não houve diferença ($P > 0,05$) nas taxas de

blastocisto na comparação entre os grupos TCM199® e Alpha MEMB suplementado com 1, 10 ou 100ng/ml de insulina. No entanto, o meio Alpha MEMB + 100ng/mL de insulina apresentou maior taxa ($P < 0,05$) de produção de blastocistos comparado ao meio Alpha MEMB livre de insulina. Esses resultados são semelhantes aqueles encontrados por Lee *et al.* (2005). Tais autores verificaram efeito benéfico da insulina quando adicionada a MIV de oócitos suínos. A adição de 100ng/mL ao meio de maturação dos oócitos foi capaz de aumentar a taxa de formação de blastocistos comparada ao meio livre de insulina.

Porém, no presente estudo, verificou-se que 100ng/mL de insulina não promoveu aumento na produção de embriões no estágio de blastocisto comparado aos demais grupos (controle e Alpha MEMB + 1 ou 10ng/mL de insulina). No trabalho de Vireque *et al.* (2009) observa-se que o meio Alpha MEM acrescido de 100ng/mL de insulina, porém, livre de FSH, apresenta taxa de 40% de blastocistos. No entanto tal produção de embrião também não foi superior ao meio Alpha MEM suplementado com PVP e TCM199® + SFB.

Comparativamente ao estudo de Vireque *et al.* (2009), os resultados apresentados no presente estudo apontam taxa de blastocistos 3,9% menor em meio Alpha MEM + 100ng/mL. Na formulação do meio Alpha MEM utilizado por Vireque *et al.* (2009), foi acrescentado 10ng/mL de IGF-1 humana recombinante. O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) regula a proliferação e diferenciação de células em mamíferos (Benito *et al.* 1996). Makarevich e Markkula (2002) demonstraram que a suplementação por IGF-1 em meio de maturação de oócitos bovinos, aumenta a formação de mórulas e blastocistos comparado ao meio controle (sem adição de IGF1). Além disso, maior proporção de células do embrioblasto em relação ao total de células embrionárias em blastocistos é

encontrada quando vacas são submetidas à infusão intra-ovariana de IGF-1 (Velazquez et al 2012). Tais estudos denotam efeito benéfico do IGF1 tanto *in vitro* quanto *in vivo*, que podem justificar maior taxa encontrada por Vireque et al (2009).

As doses de 1 e 10ng/mL de insulina não promoveram aumento das taxas de produção de blastocistos comparativamente ao meio Alpha MEMB livre de insulina e TCM199® acrescido de soro. Diante destes achados, observa-se que em meio de MIV definido Alpha MEMB, 100ng/mL de insulina é a concentração ideal para produção de blastocistos. De fato, oócitos maturados em meio Alpha MEMB com a concentração mais alta de insulina apresentaram maior taxa de maturação e menor quantidade de transcritos relacionados ao estresse celular.

Como já mencionado anteriormente, o adequado cross talk entre oócitos e células do cumulus favorece a competência dos CCOs para a produção de embriões *in vitro* (Gilchrist et al 2008). No presente estudo, as células do *cumulus* não foram submetidas a qualquer tipo de análise. Mesmo assim, é provável que a insulina tenha atuado nas células do *cumulus* e promovido uma melhor comunicação entre estas e o oócito. Em recente estudo, Salhab et al. (2012) verificaram que a maturação *in vitro* de CCOs altera a expressão de genes e vias de sinalização de células do cumulus em bovinos.

De acordo com os resultados encontrados, a dose de 100ng/mL de insulina aumentou a produção de embriões a partir de oócitos maturados em Alpha MEMB comparativamente ao meio livre de insulina. Tal concentração respondeu ainda por taxa de maturação nuclear similar ao grupo controle (TCM199®) e redução na expressão de transcritos associados ao estresse celular em ambiente de cultivo, em comparação com o Alpha MEMB livre de insulina.

6-CONCLUSÃO

A adição de 100ng/mL de insulina em meio de maturação Alpha MEMB livre de soro aumenta taxa de maturação nuclear em oócitos bovinos.

A adição de 100ng/mL de insulina em meio de maturação Alpha MEMB livre de soro aumenta a taxa de produção de blastocistos bovinos.

A adição de 1, 10 e 100 ng/mL insulina em meio de maturação Alpha MEMB livre de soro diminuiu a quantidade do transcrito GDF9.

As doses de 1, 10 e 100ng/mL de insulina adicionadas em meio de maturação Alpha MEMB livre de soro não alteraram a quantidade do transcrito GLUT1.

A adição de 10 e 100 ng/mL de insulina em meio de maturação Alpha MEMB livre de soro diminuiu a quantidade do transcrito PRDX1.

A adição de 1, 10 e 100 ng/mL insulina em meio de maturação Alpha MEMB livre de soro diminuiu a quantidade do transcrito HSP 70.1.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, N.; DING, J.; SMITH, G. Insulin signaling in mouse oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 872-879, 2007.

ALI, A, SIRARD, M-A. Effect of the Absence or Presence of Various Protein Supplements on Further Development of Bovine Oocytes During In Vitro Maturation. **Biology of Reproduction** v.66, p.901–905, 2002.

ALM, H.; TORNER,H.; LÖHRKE VIERGUTZ, GHONEIM.I.M.; KANITZ, W. Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Theriogenology**, v.63, p.2194-2205, 2005.

AL-KATANANI, Y.M.; HANSEN, P.J.. Induced thermotolerance in bovine twocellembryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, p.174-180, 2002.

AMSTERDAM, A.; MAY, J. V.; SCHOMBERG, D.W.Synergistic Effect of insulin and follicle-stimulating hormone on biochemical and morphological differentiation of porcine granulose cells in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 379-390, 1988.

ANDERSEN, A. S., KJELDSSEN, T., WIBERG, F. C., VISSING, H., SCHÄFFER, L., RASMUSSEN, J. S., DE MEYTS, P. AND MØLLER, N. P. Identification of determinants that confer ligand specificity on the insulin receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v.267, p.13681-13686, 1992.

BASSO, A.C.; ESPER, C.R. Isolamento e caracterização ultraestrutural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science.**, v.39, p.311-319, 2002.

BENITO, M., VALVERDE A.M., LORENZO M. IGF-I: a mitogen also involved in differentiation processes in mammalian cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**,v.28, p.499 –510,1996.

BAVISTER, B. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction Update**, v.1, p. 91-148, 1995.

BERTOLINI, M., BEAM, S. W., SHIM, H., BERTOLINI, L. R., MOYER, A. L., FAMULA, T. R. AND ANDERSON, G. B. Growth, development, and gene expression by in vivo- and in vitro-produced day 7 and 16 bovine embryos. **Molecular Reproduction Development**, v.63, p.318-328, 2002.

BETTEGOWDA, A., PATEL, O. V., IRELAND, J. J. AND SMITH, G. W. Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, beta-glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, beta-actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis in vitro. **Molecular Reproduction Development**, v.73, p.267-278, 2006.

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

CAMARGO, L.S.A., VIANA, J.H.M. SÁ, W.F., FERREIRA A.M., RAMOS, A.A, VALE FILHO, V.R. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction Science**, v.3,p.19-28, 2006.

CAMARGO, L., VIANA, J., SÁ, W., FERREIRA, A. , VALE FILHO, V. Developmental competence of oocytes from prepubertal *Bos indicus* crossbred cattle. **Animal Reproduction Science**, v.85, p.53-59, 2005.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; RAMOS, A.A.; SERAPIAO, R.V.; SA, W.F.; FERREIRA, A.M.; GUIMARAES, M.F.M.; VALE FILHO, V.R.. Developmental competence and expression of the Hsp70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, v.68,p 626-632, 2007.

CHRISTIANS, E.S.; ZHOU, Q.; RENARD, J.; BENJAMIN, I.J. 2003. Heat shock proteins in mammalian development. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v.14, p. 283-290, 2003.

CÓRDOVA, B., MORATÓ, R., IZQUIERDO, D., PARAMIO, T., MOGAS, T. Effect of the addition of insulin-transferrin-selenium and/or L-ascorbic acid to the *in vitro* maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. **Theriogenology**, v.74, p.1341-8, 2010.

DE LOOS, F., VAN MAURIK, P., VAN BENEDEN, T. AND KRUIP, T. Structural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Molecular Reproduction Development**, v. 31, p.208-214, 1992.

DODE, M.A.N.; ADONA, P.R. Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. **Animal Reproduction Science**, v.65, p.171-180, 2001.

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

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte size in relationship to follicular diameter, maturational competence and rna synthesis. **Theriogenology**, v.43, p.209 1995.

FAIR, T., CARTER, F., PARK, S., EVANS, A. AND LONERGAN, P. Global gene expression analysis during bovine oocyte in vitro maturation. **Theriogenology**, v.68 Supl 1, S91-97,2007.

FURNUS, C.C., DE MATOS, D.G., MOSES, D.F. Cumulus expansion during in vitro maturation of bovine oocytes: relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. **Molecular Reproduction Development**, v. 51 (1), p.76–83, 1998

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

GILCHRIST RB, LANE M, THOMPSON JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v.14, p.159–177, 2008.

GILCHRIST, RB., THOMPSON, JG. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v.67, p.6-15, 2007.

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.61-79, 2000.

GORDON, I. R. Laboratory production of cattle embryo. Second Ed. CAB International, p.1- 537, 2003

GORDON, I. R. Laboratory Production of Cattle Embryo. London: CAB International. Cambridge University Press, p.1-464, 1994

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M.; SUZUKI, D.T.; MILLER J.H. Introdução a genética. Rio de Janeiro: Ed.Guanabara Koogan, p.1-23, 2006.

GSTRAUNTHALER, G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. **ALTEX**, v.20, p.275-281, 2003.

GULART, L.V.M. (2009) Efeito do FSH adicionado aos meios definidos de maturação oocitaria sobre o desenvolvimento precoce de embriões bovinos. **Dissertação de mestrado**, Faculdade de Medicina,UnB.

GUTIÉRREZ, C. G., CAMPBELL, B. K. AND WEBB, R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. **Biology of Reproduction**, v.56, p.608-616,1997.

GUTTERIDGE J.M. Antioxidant properties of the proteins caeruloplasmin, albumin and transferrin. A study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.869, p.119–127, 1986.

HENDRIKSEN, P.J.M., VOS PLAM., STEENWENG, M.M., BEVERS, M.M., DIELEMAN, S.J. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. **Theriogenology**, v.53 p.11-20, 2000.

HUMBLLOT, P., HOLM, P., LONERGAN, P., WRENZYCKI, C., LEQUARRÉ, A. S., JOLY, C. G., HERRMANN, D., LOPES, A., RIZOS, D., NIEMANN, H. AND CALLESEN, H. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.63, p.1149-1166, 2005.

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

JEONG, Y.W., HOSSEIN, M.S., BHANDARI, D.P., KIM, Y.W., KIM, J.H., PARK, S.W., LEE, E., PARK, S.M., JEONG, Y.I., LEE, J.Y., KIM, S., HWANG, W.S. Effects of insulin-transferrin-selenium in defined and porcine follicular fluid supplemented IVM media on porcine IVF and SCNT embryo production. **Animal Reproduction Scientiae**, v.106, p. 13-24, 2008.

KASAHARA, M., HINKLE, P. Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.252, p.7384-7390,1977.

KAWARSKY, S. , KING, W. Expression and localisation of heat shock protein 70 in cultured bovine oocytes and embryos. **Zygote**, v.9, p.39-50,2001.

KHATIR, H.; LONERGAN, P.; MERMILLOD, P. Kinetics of nuclear maturation and protein profiles of oocytes from prepubertal and adult cattle during in vitro maturation. **Theriogenology**, v.50, p. 917-929, 1998.

KIM, N.H., Cho, S.K. Choi, S.H. KIM, E.Y., PARK, S.P. LIM, J.H. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes in vitro maturation. **Zygote**, v.8, p.25-32, 2000.

LEE, M. S., KANG, S. K., LEE, B. C. , HWANG, W. S. The beneficial effects of insulin and metformin on in vitro developmental potential of porcine oocytes and embryos. **Biology of Reproduction**, v.73, p.1264-1268, 2005.

LEONI, G., BEBBERE, D., SUCCU, S., BERLINGUER, F., MOSSA, F., GALIOTO, M., BOGLIOLO, L., LEDDA, S. AND NAITANA, S. Relations between relative mRNA abundance and developmental competence of ovine oocytes. **Molecular Reproduction Development** v. 74, p.249-257, 2007.

LEQUARRE, A.S., GRISART, B., MOREAU, B., SCHUURBIERS, N., MASSIP, A., DESSY, F. Glucose metabolism during bovine preimplantation development: analysis of gene expression in single oocytes and embryos. **Molecular Reproduction and development**, v.48, p.216-26, 1997.

LEYENS, G., KNOOPS, B., DONNAY, I. Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Molecular Reproduction Development**, v.69, p.243-251, 2004.

LONERGAN, P., FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, p.17-22, 2008.

LONERGAN, P., RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., FAIR, T., BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction Domestic Animals**, v.38, p.259-67, 2003.

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

LONERGAN, P., RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., MOREIRA, P.M., PINTADO, B., DE LA FUENTE, J., BOLAND, M.P. Divergence of gene expression in bovine zygotes cultured to the blastocyst stage in vivo or in vitro. **Biology of Reproduction**, v.69,p.1424-31, 2006.

LOPATA, A., HAY, D. L. The potential of early human embryos to form blastocysts, hatch from their zona and secrete HCG in culture. **Human Reproduction**, v.4, p.87-94, 1989.

LOPES, A.S., WRENZYCKI, C., RAMSING, N.B., HERRMANN, D., NIEMANN, H., LOVENDAHL, P., GREVE, T., CALLESEN, H. Respirations rates correlate with

mRNA expression of G6PD and GLUT1 genes in individual bovine in vitro-produced blastocysts. *Theriogenology*, v.68, p.223-236, 2007.

MAYES, M.A.; SIRARD, M.A. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. ***Theriogenology***, v.55, n. 55, p.911-922, 2001.

MAKAREVICH A.V., MARKKULA M. Apoptosis and Cell Proliferation Potential of Bovine Embryos Stimulated with Insulin-Like Growth Factor I During In Vitro Maturation and Culture. ***Biology of Reproduction***, v.66, p.386–392, 2002.

MCGRATH, S. A., ESQUELA, A. F., LEE, S. J. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. ***Molecular Endocrinology***, v. 9,p.131-136,1995.

MINGOTI, G. Z., CASTRO, V. S. D. C, MÉO, S. C., BARRETTO, L. S. S., GARCIA, J. M. The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine in vitro procedures on kinetics of oocyte maturation and embryo development. ***In Vitro Cellular Developmental Biology—Animal*** (2011) v.47 p.361–367, 2011.

MIYAMURA, M., YOSHIDA, M., HAMANO, S., KUWAYAMA, M.. Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. ***Theriogenology*** v. 43 (1), p.282, 1995.

MILLER, G.F., RORIE, R.W. Effect of oxygen concentration during oocyte maturation on subsequent bovine embryo cleavage and development *in vitro*. ***Research Series***. Arkansas Agricultural Experiment Station,v.478, pp. 43–44, 2000.

MOTA, G.B.; BATISTA, R.I.T.P.; SERAPIAO, R.V.; BOITE, M.C.; VIANA, J.H.M.; TORRES, C.A.A.; CAMARGO, L.S.A. Developmental competence and expression of the MATER and ZAR1 gene in immature bovine oocytes selected by Brilliant Cresyl Blue. **Zygote**, v. 26, p. 1-8, 2009.

MOUROT, M., DUFORT, I., GRAVEL, C., ALGRIANY, O., DIELEMAN, S. , SIRARD, M. A. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Molecular Reproduction Development**, v. 73, p.1367-1379, 2006.

NEUMANN, C. A., KRAUSE, D. S., CARMAN, C. V., DAS, S., DUBEY, D. P., ABRAHAM, J. L., BRONSON, R. T., FUJIWARA, Y., ORKIN, S. H. , VAN ETTEN, R. A. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. **Nature**, v.424, p.561-565, 2003.

NEWCOMB, R.; CHRISTIE W.B.; ROWSON L.E. Birth of calves after in vivo fertilisation of oocytes removed from follicles and matured in vitro. **Veterinary Record**, v.102, p. 461-2, 1978.

NIEMANN, H., WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, v. 53, p. 21-34, 2000.

OCAÑA QUERO, J.M., PINEDO-MERLIN, M., ORTEGA- MARISCAL, M., MORENO-MILLAN, M. Influence of human and bovine insulin on *in vitro* maturation, fertilization and cleavage rates of bovine oocytes. **Archivos de Zootecnia**, v. 47, p. 85–93, 1998.

OLIVEIRA E SILVA, I., VASCONCELOS, R.B., CAETANO, J.V.O., GULART, L.V.M., CAMARGO, L.S.A., BÁO, S.N., ROSA E SILVA, A.A. Induction of reversible meiosis arrest of bovine oocytes using a two-step procedure under defined and nondefined conditions. **Theriogenology**, v.75, p.1115-1124, 2010.

OLSON, A.L., PESSIN, J.E. Estructure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. **Annual Reviews Nutrition**, v. 16, p.235-56, 1996.

OTOI, T., YAMAMOTO, K., KOYAMA, N., TACHIKAWA, S., SUZUKI, T. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. **Theriogenology**, v. 48, p. 769-774, 1997.

PASTORE, A., FEDERICI, G., BERTINI, E., PIEMONTE, F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica. Chimica. Acta** v. 333, p. 19–39, 2003.

PEREIRA, M.M., MACHADO, M.A., COSTA, F.Q., SEREPIÃO, R.V., VIANA, J.H.M., CAMARGO, L.S.A. Effect of oxygen tension and serum during IVM on developmental competence of bovine oocytes. **Reproduction Fertility and Development**, v.22, p.1074-1082, 2010.

PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocytes growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, p.27-37, 1998.

PINYOPUMMINTR, T., BAVISTER, B.D. Effect of gaseous atmosphere on *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 41, p. 276, 1994.

PRICE, P., GREGORY, E. Relationship between in vitro growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement. **In Vitro**, v.18, p. 576-584, 1982.

RAGHU, H.M., NANDI, S., REDDY, S.M. Effect of insulin, transferrin and selenium and epidermal growth factor on development of buffalo oocytes to the blastocyst stage in vitro in serum-free, semidefined media. **Veterinary Record**, v.151, p.260-5, 2002

RIEGER, D., LOSKUTOFF, N.M. Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. **Journal Reproduction Fertility**, v.100, p.257-62, 1994.

RIZOS, D., WARD, F., DUFFY, P., BOLAND, M. , 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, p. 234-248, 2002.

RODRIGUEZ, K.F., FARIN, C,E. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. **Repreoduction Fertility and Development**, v.16, p.55-67, 2004.

ROSE, T., BAVISTER, B. Effect of oocyte maturation medium on in vitro development of in vitro fertilized bovine embryos. **Molecular Reproduction Development**, v.31, p. 72-77, 1992.

ROSA E SILVA AAM, OLIVEIRA E SILVA I, VASCONCELOS RB, GULART LVM, ROSA E SILVA LG. Meios de cultura para maturação de oócitos de mamíferos, processo de obtenção dos mesmos e processos de inibição-reversão da maturação

nuclear e aceleração da maturação citoplasmática e suas aplicações para a produção de embrião *in vitro*. **Patente**, PI número: 0803140-1, data de depósito 12/05/2008. Fundação Universidade de Brasília.

ROUDEBUSH, W. E., OFTEN, N. L. , BUTLER, W. J. Alpha-minimum essential medium (MEM) enhances *in vitro* hatched blastocyst development and cell number per embryo over Ham's F-10. **Journal of Assisted Reproduction Genetics**, v.11, p. 203-207, 1994.

RUSSELL, D., BAQIR, S., BORDIGNON, J., BETTS, D. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular Reproduction Development**, v. 73, p.1255-1270, 2006.

SALHAB, M. DHORNE-POLLET, S., AUCLAIR, S, GUYADER-JOLY, C., BRISARD D., DALBIES-TRAN, R., DUPONT, J., PONSART C., MERMILLOD P., UZBEKOVA. S. *In vitro* maturation of oocytes alters gene expression and signaling pathways in bovine cumulus cells. **Molecular Reproduction Development**. 2012 Dec 27. doi: 10.1002/mrd.22148. [Epub ahead of print]

SAGIRKAYA, H., MISIRLIOGLU, M., KAYA, A., FIRST, N., PARRISH, J. , MEMILI, E. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. **Animal Reproduction Science**, v.101, p. 225-240, 2007.

SCHÄFFER, L. A model for insulin binding to the insulin receptor. **European Journal Biochemistry**, v.221, p.1127-1132, 1994.

SHIMIZU, T., MURAYAMA, C., SUDO, N., KAWASHIMA, C., TETSUKA, M. , MIYAMOTO, A. Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular

development in the bovine ovary. **Animal Reproduction Science**, v. 106, p. 143-152, 2008.

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

SUNG, C.K., GOLDFINE, I.D. Insulin receptor signaling. **Biomembranes**, v. 6, p.3-15, 1996.

SUTTON, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Effects of in-vivo and *in vitro* environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Human Reproduction Update**, v.19, p.35-48, 2003.

TAKAYAMA, S., REED, J.C., HOMMA, S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. **Oncogene**, v.22, p.9041-9047, 2007.

THOMPSON, J.G., LANE, M., GILCHRIST, R.B. Metabolism of the bovine cumulus-oocyte complex and influence on subsequent developmental competence. **Society for Reproduction and Fertility**, v.64, p.179-90, 2007.

Van den HURK. R.; ZAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717-1757, 2005.

VASCONCELOS, R.B. Caracterização morfofuncional das células somáticas de folículo ovariano bovino, cultivado em meio de cultura definido, não indutor de luteinização. **Dissertação de mestrado**, Faculdade de Medicina, UnB, 2008.

VELAZQUEZ, M.A., HADELER, K.-G., HERRMANN, D., KUES, W.A., RÉMY B., BECKERS, J.-F., Niemann, H. *In vivo* oocyte IGF-1 priming increases inner cell mass proliferation of *in vitro*-formed bovine blastocysts. **Theriogenology** v.78 p.517-527, 2012.

VIANA, J.H.M., DE ALMEIDA CAMARGO, L., DE MORAES FERREIRA, A., DE SA, W., DE CARVALHO FERNANDES, C. , DE PINHO MARQUES JUNIOR, A. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, v.84, p.1-12, 2004.

VIREQUE, A.A. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos co-cultivados com células da granulosa produtoras de estradiol em meio quimicamente definido. **Dissertação de mestrado**, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, 2003.

VIREQUE, A.A., CAMARGO, L.S.A., SERAPIÃO, R.V., ROSA E SILVA, A.A.M., WATANABE, Y.F., FERREIRA, E.M., NAVARRO, P.A.A.S., MARTINS, W.P., FERRIANI, R.A. Preimplantation development and expression of Hsp 70 and Bax genes in bovine blastocysts derived from oocytes matured in alpha-MEM supplemented with growth factors and synthetic macromolecules. **Theriogenology**, v. 71, p.620-627, 2009.

WANG, X., LIU, X. T., DUNN, R., OHL, D. A. , SMITH, G. D. Glycogen synthase kinase-3 regulates mouse oocyte homologue segregation. **Molecular Reproduction Development**, v. 64, p. 96-105, 2003.

WILKINSON, R.F.; MING, R.; ANDERSON, B. The use of neural networks in developing novel embryo culture media formulations. **Theriogenology**, v.45, p.41-49, 1996.

WILSON, C.M., MITSUMOTO, Y., MAHER, F., KLIP, A. Regulation of cell surface GLUT1, GLUT3, and GLUT4 by insulin and IGF-I in L6 myotubes. **FEBS Letters**, v.368, p.19–22, 1995.

WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., CARNWATH, J.W., NIEMANN, H. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. **Molecular Reproduction and Development**, v.53, p.8-18, 1999.

WU, S.H. OLDFIELD, J.E. WHANGER, P.D. WESWIG, P.H. Effect of selenium, vitamin E, and antioxidants on testicular function in rats. **Biology Reproduction**, v.8 p. 625–629, 1973.

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, p471-472, 1998.

ZHANG, X.; LI, X.H.; MA, X.; WANG, Z.H.; LU, S.; GUO, Y.L. Redox-induced apoptosis of human oocytes in resting follicles in vitro. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, V.13, p. 451-458, 2006.