



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO-10 NA PRODUÇÃO
IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS**

MATEUS NUNES DIÓGENES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF

MARÇO DE 2015



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO-10 NA PRODUÇÃO
IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS**

MATEUS NUNES DIÓGENES

ORIENTADORA: MARGOT ALVES NUNES DODE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO 130/2015

BRASÍLIA

MARÇO/2015

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

DIÓGENES, M. N.. **Efeito do fator de crescimento de fibroblasto-10 na produção *in vitro* de embriões bovinos**. Brasília: Faculdade de agronomia e medicina veterinária, Universidade de Brasília, 2015, 88 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

D591e

DIÓGENES, Mateus Nunes. **Efeito do fator de crescimento de fibroblasto-10 na produção *in vitro* de embriões bovinos**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2015. 88p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2015.

1. Pré-maturação. 2. Cilostamida. 3. Retenção meiótica. 4. Expansão 5. Qualidade embrionária . I DODE, Margot Alves Nunes. II. PhD.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO-10 NA PRODUÇÃO
IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS**

MATEUS NUNES DIÓGENES

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS Á OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADA POR:

**MARGOT ALVES NUNES DODE, PhD (EMBRAPA-CENARGEN)
(ORIENTADORA)**

IVO PIVATO, Dr.(UNB)

**FABIANA DE ANDRADE MELO STERZA, PhD (UEMS)
(EXAMINADORA EXTERNA)**

BRASÍLIA/DF, 19 DE MARÇO DE 2015

Dedico esta conquista a Deus, por ter permitido a conclusão deste sonho, aos meus pais, Carlos Roberto e Ana Luisa e minhas irmãs, Amanda e Beatriz, pelas palavras de incentivo e carinho durante todo o tempo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim e não mediram esforços para me dar as melhores oportunidades de estudo. Vocês são meus exemplos, a razão do meu esforço, a quem devo essa conquista. Amo Vocês!

Ás minhas irmãs, pelo carinho, amor, confiança e incentivo partilhado durante toda a minha vida. Amo vocês!

Aos meus avós, tios, tias, primos e primas por torcerem e me incentivarem durante esta jornada. Muito obrigado!

Á minha orientadora, Dra. Margot, pelos conhecimentos passados e pela confiança e apoio durante todo o período que passei em Brasília. Você é um exemplo de profissional. Muito obrigado!

Ao professor Ivo Pivato, pelos conhecimentos passados e pelos exemplos de dedicação, serenidade e humildade. Muito obrigado!

Á Dra. Fabiana Melo, pela participação na minha banca examinadora, que foi fundamental para a conclusão do trabalho final. Muito Obrigado!

Aos que contribuíram diretamente para a execução deste trabalho, Urias, José Felipe, dra. Margot, Ligiane Leme, Ana Luiza, Rosângela, Rabinho, sr. Arlindo, sr. Zequinha, Sidney, estagiários e aos funcionários do frigorífico Qualimax (Luziânia-GO). Muito obrigado!

Aos meus colegas de alojamento, Zé, Eleonora, Chico, Carolle, Oscar, Nathália, Felipe, Renato, Anelise, João, Malane, Nayara, Thaís, Luzia, Paraíba, Pricylla, Gilberto e todos os estagiários, pelas amizades, brincadeiras e ensinamentos. Muito obrigado!

Aos professores do Programa de pós-graduação em ciências animais da UnB, pelos conhecimentos transmitidos. Muito obrigado!

Aos pesquisadores da EMBRAPA-CERNARGEN pela confiança e pelos conhecimentos passados. Muito obrigado!

A todos os funcionários da Fazenda Sucupira, pelas ajudas quando mais precisei. Muito obrigado!

A todos os outros amigos do curso de Mestrado em Ciências animais e de fora dele, que de algum modo contribuíram para a minha formação pessoal. Muito obrigado!

Ao frigorífico Qualimax por ceder material biológico para a realização desse experimento.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Aos animais, por tornarem o trabalho uma fonte de estímulo, alegria e força. Muito obrigado!

ÍNDICE

	PÁGINAS
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	xiv
CAPÍTULO 1	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO GERAL	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 OVOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE	3
2.2 MATURAÇÃO OVOCITÁRIA	6
2.3 CONTROLE DA MATURAÇÃO: MANUTENÇÃO E RETOMADA DA MEIOSE	9
2.4 PAPEL DOS FATORES DE CRESCIMENTO NA MIV	12
2.5 EXPRESSÃO DE GENES SELECIONADOS	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
CAPÍTULO 2. EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO-10 NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	31
RESUMO	32
ABSTRACT	33
1 INTRODUÇÃO	34
2 MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1 REAGENTES E PRODUTOS QUÍMICOS	36
2.2 RECUPERAÇÃO E SELEÇÃO DOS OVÓCITOS	36
2.3 PRÉ-MATURAÇÃO E MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	37
2.4 SOLUÇÃO ESTOQUE DE CILOSTAMIDA E FGF10	37
2.5 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE MATURAÇÃO NUCLEAR	38
2.6 AVALIAÇÃO DA EXPANSÃO DAS CCS	38
2.7 FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i>	38
2.8 CULTIVO <i>IN VITRO</i>	40
2.9 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE EMBRIÕES	40
3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	42
3.1 EXPERIMENTO 1: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FGF10 DURANTE A MIV NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	42
3.2 EXPERIMENTO 2: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FGF10 DURANTE A PRÉ-MATURAÇÃO E/OU MATURAÇÃO NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	43
4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 EXPERIMENTO 1	45
5.2 EXPERIMENTO 2	48
5.3 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

RESUMO

EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO-10 NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Mateus Nunes Diógenes¹, Margot Alves Nunes Dode²

¹Médico Veterinário, Brasília-DF, Brasil, ²Pesquisadora PhD, Brasília-DF, Brasil

O presente estudo visou avaliar o efeito do FGF10 durante a pré-maturação e/ou maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos na produção *in vitro* de embriões bovinos. No primeiro experimento, os ovócitos foram maturados na presença ou não de FGF10. No segundo experimento, foi avaliado o efeito da suplementação de FGF10 durante a pré-maturação e/ou maturação, utilizando cinco grupos: T1: ovócitos maturados por 22h (controle); T2: ovócitos pré-maturados por 22h e maturados por 22h; T3: ovócitos pré-maturados por 22h e maturados por 22h com FGF10; T4: ovócitos pré-maturados por 22h com FGF10 e maturados por 22h; T5: pré-maturados por 22h com FGF10 e maturados por 22h com FGF10. Em ambos os experimentos foram avaliadas a maturação nuclear, a expansão das células do *cumulus*, a produção embrionária e a expressão dos genes: KRT8, PLAC8, CD9, PAG2, HSPB1 e MSH6 em embriões no D7 (experimento 1) ou D8 (experimento 2). Os dados de maturação nuclear e desenvolvimento embrionário foram analisados pelo teste do Qui-quadrado, e os da expansão das células do *cumulus* e expressão gênica por análise de variância, sendo $P < 0,05$ considerado significativo. No primeiro experimento, a suplementação com FGF10 durante a MIV não afetou ($P > 0,05$) nenhum dos parâmetros avaliados. No segundo experimento, após a maturação, a expansão em todos os tratamentos submetidos à pré-maturação, independente da presença de FGF10 ($P < 0,05$), foi menor do que no grupo controle. A presença de FGF10 na pré-maturação/maturação não aumentou a quantidade de embriões sendo a taxa de blastocisto em D7 similar ($P > 0,05$) entre T2 (43,7%), T3 (38,7%), T4 (39,6%) e T5 (47,3%). Entretanto, nos grupos T2 e T5 a taxa de blastocisto no D7 foi similar ao controle (53,4%). Todos os grupos apresentaram taxas de embriões eclodidos do D8 semelhantes. O nível de transcritos para o PLAC8 foi superior no grupo T4 quando comparado ao T1, os demais grupos foram iguais entre si. Já para o gene MSH6, somente foi detectada diferença no nível de transcritos entre os grupos T5 e T1, sendo inferior no T5. Conclui-se que a presença de FGF10 durante a MIV e/ou pré-MIV não tem efeito benéfico na produção e a qualidade dos embriões. Da mesma forma, a pré-maturação, independente da presença do FGF10, afeta a expansão das células do *cumulus* mas não tem efeito na produção embrionária.

Palavras chave: Pré-maturação, cilostamida, retenção meiótica, expansão, qualidade embrionária.

ABSTRACT

EFFECT OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR 10 ON *IN VITRO* PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS

Mateus Nunes Diógenes¹, Margot Alves Nunes Dode²

¹Veterinary, Brasília-DF, Brazil, ²Researcher, PhD, Brasília-DF, Brazil

This study aimed to evaluate the effect of FGF10 during pre-maturation and *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes on *in vitro* embryo production (IVP). In the first experiment oocytes were matured in the presence or not of FGF10. In the second experiment, the effect of FGF10 during pre-maturation and/or maturation was evaluated using 5 experimental groups: T1: oocytes matured for 22h (control); T2: oocytes pre-matured for 22h and matured for 22h; T3: oocytes pre-matured for 22h and matured for 22h with FGF10; T4: oocytes pre-matured with FGF10 for 22h and matured for 22h; T5: oocytes pre-matured for 22h with FGF10 and matured for 22h with FGF10. In both experiments, nuclear maturation, *cumulus* cells expansion, embryo production and the relative expression of genes: KRT8, PLAC8, CD9, PAGE2, HSPB1 and MSH6 were evaluated. Data of nuclear maturation and embryo development were analyzed by chi-square test and those of *cumulus* cells expansion and gene expression by analysis of variance. $P < 0.05$ was considered statistically significant. There was no effect of FGF10 supplementation during IVM on any of the parameters evaluated in the first experiment. On the second experiment after maturation a lower *cumulus* expansion was observed in all treatments submitted to pre-maturation, irrespective of FGF10 presence, than the control. The supplementation of pre-maturation or maturation medium with FGF10 did not cause an increase in embryo production on D7, being the blastocyst rate similar among T2 (43.7%), T3 (38.7%), T4 (39.6%) e T5 (47.3%). However, blastocyst rate was similar between T2, T5 and control (53, 4%). All groups had similar hatching rates on D8. Transcripts level for PLAC8 was higher on T4 compared to T1, and similar for the other groups. For MSH6 gene, differences in transcripts level were only observed between T5 and T1. It can be concluded that presence of FGF10 during IVM and/or pre-maturation have not affected embryo production or quality. Pre-maturation, regardless presence of FGF10, affected *cumulus* expansion but not embryo production.

Keywords: pre-maturation, cilostamide, meiotic arrest, expansion, embryo quality.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura	Página
Capítulo 2	
Figura 2.1. Fotografia mostrando a medição da área de expansão dos complexos- <i>cumulus</i> -ovócitos antes a maturação <i>in vitro</i> com o programa Motic Image Plus 2.0.	39
Figura 2.2. Fotografia mostrando a medição da área dos complexos- <i>cumulus</i> -ovócitos após da maturação <i>in vitro</i> com o programa Motic Image Plus 2.0.	39
Figura 2.3. Área de expansão dos complexos- <i>cumulus</i> -ovócitos submetidos à maturação <i>in vitro</i> por 22h no grupo controle e no grupo em que o meio de maturação foi suplementado com 0,5 ng/mL de FGF10. Os dados foram obtidos da subtração do valor da área inicial média de cada CCOs (μm^2 – micrômetros quadrados) do valor da área final média de cada CCOs após a maturação <i>in vitro</i> . Os dados são expressos como média \pm desvio padrão e foram analisados pelo teste T ($P > 0,05$).	46
Figura 2.4. Nível de transcritos dos genes KRT8, PLAC8, CD9, PAG2, HSPB1 e MSH6 analisados por PCR em tempo real em embriões bovinos oriundos de complexos cumulus ovócitos maturados na presença (FGF) ou não (Controle) de FGF10. Cada grupo foi analisado utilizando-se três <i>pools</i> de blastocistos expandidos de diferentes réplicas. Os dados (média \pm dp) foram normalizados pelo gene ACTB e expressos em relação à amostra controle, através do método $\Delta\Delta\text{Ct}$ com correção da eficiência. Os dados foram analisados pelo teste Teste t (Welch-Satterthwaite approximation) ($P < 0,05$).	48
Figura 2.5. Área de expansão dos complexos- <i>cumulus</i> -ovócitos durante a pré-maturação por 22h. No grupo controle a pré-maturação foi realizada na ausência de FGF-10 e no grupo FGF-10 o meio de foi suplementado com 0,5 ng/mL de FGF10. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão e foram analisados com o teste de Tukey. Os dados foram obtidos do valor da área média inicial (0 hora) (μm^2 – micrômetros quadrados) dos CCOs e do valor da área média dos CCOs após a pré-MIV (22 horas).	51
Figura 2.6. Área de expansão de complexo- <i>cumulus</i> -ovócitos submetidos à pré-maturação por 22 horas com (Pré-MIV FGF10) e sem FGF10 (Pré-MIV controle) e posteriormente maturados por 22 horas com (MIV FGF10) e sem FGF10 (MIV controle). Diferentes letras nas colunas representam diferenças significativas ($P < 0,05$). Os dados são expressos como média e \pm desvio padrão e foram analisados com o teste de Tukey. Os dados foram obtidos do valor da área média inicial (0 hora) (μm^2 -micrômetros quadrados) dos CCOs subtraído do valor da área média final dos CCOs após a MIV (22 horas).	52
Figura 2.7. Nível de transcritos dos genes KRT8, PLAC8,	54

<p>CD9, PAG2, HSPB1 e MSH6 analisados por PCR em tempo real em embriões bovinos oriundos de complexos cumulus ovócitos pré - maturados na presença ou não de FGF10 e posteriormente maturados na presença ou não de FGF10. T1 = controle; T2 = grupo pré-MIV controle – MIV cotrole; T3 = grupo pré-MIV controle – MIV FGF10; T4 = grupo pré-MIV FGF10 – MIV controle e T5 = grupo pré-MIV FGF10 – MIV FGF10. Cada grupo foi analisado utilizando-se três <i>pools</i> de blastocistos eclodidos de diferentes réplicas. Os dados (média ± DPM) foram normalizados pelo gene ACTB e expressos em relação à amostra controle, através do método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência. Os dados foram analisados pelo teste Dunnett (controle versus cada um dos grupos) ($P < 0,05$).</p>	
---	--

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Capítulo 2	
Tabela 2.1. Informação dos primers específicos usados para amplificação dos fragmentos de genes para análise em PCR em tempo real.	42
Tabela 2.2. Estágio da meiose de ovócitos bovinos cultivados em meio de maturação suplementados ou não com 0,5 ng/ml de FGF10 (FGF10) por 0, 8 e 22 horas.	45
Tabela 2.3. Efeito da exposição dos complexos- <i>cumulus</i> -ovócitos ao FGF10 durante a maturação <i>in vitro</i> (MIV+FGF10) na taxa de clivagem no dia 2 (D2) de desenvolvimento e na taxa de blastocisto no D6 e D7 de desenvolvimento de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> .	46
Tabela 2.4. Efeito da exposição dos complexos- <i>cumulus</i> -ovócitos ao FGF10 durante a maturação <i>in vitro</i> na taxa de blastocisto no D6 e D7 de desenvolvimento de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i>	47
Tabela 2.5. Estágio da meiose durante a maturação <i>in vitro</i> de ovócitos bovinos cultivados em meio de pré-maturação por 22 horas suplementado (PFGF10) ou não (Pcont) com 0,5 ng/ml de FGF10 e, posteriormente maturados por 0, 8 e 22 horas em meio de maturação suplementado (MFGF10) ou não (Mcont) com 0,5 ng/ml de FGF10	50
Tabela 2.6. Desenvolvimento embrionário nos dias (D) 2, 6, 7, e 8 de cultivo de ovócitos bovinos submetidos a pré-maturação por 22 horas em meio de suplementado (PFGF10) ou não (Pcont) com 0,5 ng/ml de FGF10, e posteriormente maturados por 22 horas em meio de maturação suplementado (MFGF10) ou não (Mcont) com 0,5 ng/ml de FGF10	52
Tabela 2.7. Estágio de desenvolvimento embrionário nos dias (D) 7 e 8 de cultivo de ovócitos bovinos submetidos a pré-maturação por 22 horas em meio de suplementado (PFGF10) ou não (Pcont) com 0,5 ng/ml de FGF10 e, posteriormente maturados por 22 horas em meio de maturação suplementado (MFGF10) ou não (Mcont) com 0,5 ng/ml de FGF10.	53

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

AI = Anáfase I
 AC = Adenilato ciclase
 cAMP = Adenosina Monofosfato cíclico
 APC/C = Complexo promotor da anáfase/ciclossomo
 AREG = Ampirreguliana
 ATP = Trifosfato de adenosina
 β actin = Beta actina
 Be = Blastocisto eclodido
 Bi = Blastocisto inicial
 Bl = Blastocisto
 BTC = Betacelulina
 Bx = Blastocisto expandido
 BSA-FAF = Albumina sérica bovina livre de ácido graxo
 BMP15 = Proteína morfogenética óssea -15
 CC = Células do *cumulus*
 Cdk = Quinase dependente de ciclina
 CDX2 = Cicloxigenase tipo 2
 CGP = Células germinativas primordiais
 CIV = Cultivo *in vitro*
 CO₂ = Dióxido de carbono
 COC = Complexo-*cumulus*-ovócito
 COX2 = Cicloxigenase tipo2
 CP = Corpúsculo polar
 cDNA = DNA complementar
 DMSO = Dimetil sulfóxido
 EGF = Fator de crescimento epidermal
 EGFR = Receptor para EGF
 EREG = Epirregulina
 FIV = Fecundação *in vitro*
 FCS = Soro fetal bovino
 FSH = Hormônio folículo estimulante
 FSHr = Hormônio folículo estimulante recombinante
 FGF = Fator de crescimento de fibroblasto
 FGFr = Receptor para fator de crescimento de fibroblasto
 GAPDH = *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
 GDF9 = Fator de crescimento e diferenciação – 9
 cGMP = Guanosina monofosfato cíclico
 GPCR = Receptor da proteína G acoplada
 GV = Vesícula germinativa
 GVBD = Quebra da vesícula germinativa
 IBMX = 1- isobutil, 3- metilxantina
 IGF = Fator de crescimento semelhante á insulina
 JG = Junções Gap
 KDa = kilodautons
 KGF-2 = Fator de crescimento de queratinócito tipo 2
 LH = Hormônio luteinizante
 LRA = Laboratório de Reprodução Animal
 M I = Metáfase I

MII = Metáfase II
MAPK = Proteína ativada por mitógeno quinase
MEK = Proteína quinase ativadora da MAPK
MPF = Fator de promoção da maturação
MIV = Maturação *in vitro*
NaCl = Cloreto de sódio
N₂ = Nitrogênio
NO = Óxido nítrico
O₂ = Oxigênio
PBS = Solução salina em tampão fosfato
q-PCR = Reação em cadeia de polimerase em tempo real
PDE = Fosfodiesterase
PHE = Penicilamina, hipotaurina e epinefrina
PIVE = Produção *in vitro* de embriões
Pi = pós-inseminação
PTGS2 = Prostaglandina sintase 2
PPIA = *Peptidylprolyl isomerase A*
mRNA = Ácido ribonucleico mensageiro
SOF = Fluido sintético do oviduto com aminoácidos
SPOM = *Simulated physiological oocyte maturation*
TI = Telófase I
TALP = *Tyrode's Albumin Lactate and Pyruvate*
TCM 199 = *Tissue culture medium 199*
TGF-β = Fator de crescimento de transformação beta
TRA = Técnicas de reprodução assistida
UI = Unidade Internacional

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A melhoria da maturação *in vitro* pode proporcionar grandes avanços nas TRAs de humanos e animais. Ela é a biotécnica responsável por gerar ovócitos com capacidade de serem fecundados e assegurarem o desenvolvimento embrionário até que o genoma embrionário seja ativado. No entanto, a retirada prematura dos ovócitos do ambiente folicular priva os ovócitos dos eventos celulares que ocorrem no final da foliculogênese. Essas reações são mediadas por fatores de crescimento intrafoliculares e por hormônios extraovarianos (Erickson & Shimasaki, 2000; Tanaka et al., 2001; Khigh & Glister, 2003; Gasperin et al., 2012).

Uma das alternativas que poderiam melhorar a produção embrionária é a adição de fatores de crescimento durante a MIV. Esses fatores provocariam algumas reações celulares benéficas nos CCOs que aconteceriam naturalmente no folículo intacto. Um dos fatores potenciais para ser adicionado, é o FGF10. Ele é um fator produzido pelas células da teca, que está ausente na MIV. Além disso, ele é produzido no próprio ovócito e seus receptores estão presentes nas células do *cumulus* (Buratini et al., 2007; Zhang & Ealy, 2012,). Suas ações durante várias etapas da formação dos gametas têm sido bastante estudadas. (Castilho et al., 2008, 2014; Gasperin et al., 2012; Portela et al., 2014) Porém, existem poucos estudos avaliando o seu efeito na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos (Zhang et al., 2010; Pomini Pinto et al., 2014).

Outra medida pra melhorar o sistema de maturação *in vitro*, tornando-o mais fisiológico, seria bloquear a retomada da meiose. Esse sistema tem como objetivo prevenir a maturação nuclear espontânea, permitindo que o ovócito sofra mudanças químicas e estruturais, que são essenciais para o bom desenvolvimento embrionário. A pré-maturação, portanto, pode proporcionar o acúmulo de substâncias benéficas no citoplasma do ovócito, chamada maturação citoplasmática, e melhorar a sincronização com a maturação nuclear.

A suplementação com fatores de crescimento durante a pré-maturação poderia incrementar ainda mais o benefício desse sistema. Porém, não foram realizados trabalhos utilizando essa combinação na PIVE de bovinos.

1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do Fator de Crescimento de Fibroblasto – 10 na pré-maturação e na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos.

1.2 Objetivos específicos

- 1- Avaliar o efeito do FGF10 durante a pré-MIV e/ou MIV na expansão das células do *cumulus*.
- 2- Avaliar o efeito do FGF10 durante a pré-MIV e/ou MIV no desenvolvimento embrionário.
- 3- Avaliar o efeito do FGF10 durante a pré-MIV e/ou MIV na qualidade dos embriões produzidos *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ovogênese e foliculogênese

A ovogênese pode ser definida como uma sequência de eventos pelos quais as células germinativas primordiais (CGP) passam até atingirem o estágio de ovócito maduro, apto a ser fecundado (Van Den Hurk & Zhao, 2005). Essas células passam por eventos de migração, multiplicação, diferenciação e divisão que, nos bovinos, iniciam por volta do 60º dia de vida fetal. Porém, o ciclo de divisão celular meiótica é bloqueado antes do nascimento e só se completa na puberdade (Mclaughlin & Mciver, 2009). Portanto, a formação do estoque de ovócitos que poderão ser utilizados durante a vida reprodutiva da fêmea ocorre antes do nascimento. Após a ativação, os ovócitos entram em crescimento, podendo ser liberados na ovulação, no final do desenvolvimento folicular, ou degeneram quando o folículo entra em atresia.

As CGPs são células indiferenciadas que dão origem aos ovócitos. Elas têm origem extragonadal e, durante o desenvolvimento embrionário, migram do epitélio do saco vitelínico para as cristas genitais, colonizando as gônadas em formação. Durante a fase de migração/colonização as CGPs aumentam em número através de intensas divisões mitóticas. Após a chegada às cristas genitais, as CGPs se diferenciam em ovogônias e continuam a se multiplicar por mitose. As ovogônias são então circundadas por células somáticas formando os cordões sexuais. Dentro dos cordões as ovogônias replicam seu DNA e iniciam a primeira divisão meiótica, passando a ser denominadas de ovócitos primários. A prófase é a primeira fase da meiose e está dividida em cinco fases: leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese (Ferreira et al., 2009). Quando o ovócito chega ao estágio de diplóteno da primeira

divisão meiótica, o ciclo meiótico é interrompido até que ocorra o estímulo do hormônio luteinizante (LH) na puberdade, que induz a retomada da meiose e término da primeira divisão (Zhang et al., 2009).

A foliculogênese também começa durante a vida fetal e só termina quando o folículo entra em atresia ou quando ocorre a ovulação, envolvendo a proliferação e a diferenciação das células somáticas que compõem o folículo. Essas transformações são controladas por diversos fatores intraovarianos, produzidos pelas próprias células que compõem o folículo e por hormônios extraovarianos (gonadotrofinas) (Erickson & Shimasaki, 2000; Tanaka et al., 2001; Khight & Glister, 2003; Gasperin et al., 2012).

Quando as ovogônias ainda estão se dividindo mitoticamente formam *clusters*, que consistem de várias ovogônias circundadas por células somáticas. As mitoses das ovogônias ocorrem simultaneamente dentro do *cluster*, mas com divisão incompleta do citoplasma, permanecendo interligadas por pontes citoplasmáticas, formando um sincício. Quando essas células vão entrar em meiose para formar os ovócitos, as células epiteliais dos cordões sexuais formam processos citoplasmáticos, invadem o sincício, quebrando-o e separando os ovócitos que passam a ser circundados por uma única camada de células, na qual se forma a lâmina basal, originando o folículo primordial. No 75º dia de gestação em bovinos, já podem ser observados folículos primordiais cujo ovócito tem um diâmetro médio de 25 µm (Lucci et al., 2002; Bessa et al., 2013). O controle da formação desses folículos está relacionado à expressão, no próprio ovócito, de fatores de crescimento da superfamília do fator do crescimento de transformação beta (TGF-β), como o fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF9) e proteína morfogenética óssea-15 (BMP15) (Khight & Glister, 2003), e de Fatores de Crescimento de Fibroblasto (FGFs), como FGF10 (Castilho et al., 2014). Esses folículos compõem a reserva de ovócitos que poderão ser utilizados na vida reprodutiva adulta, porém, permanecem quiescentes até serem ativados. O mecanismo de ativação ainda não foi totalmente elucidado, mas sabe-se que está relacionado com fatores produzidos localmente no ovário (Skinner, 2005).

O grupo de folículos primordiais ativados compõe um *pool* de folículos em crescimento e chega ao estágio de folículo primário, que pode ser observado a partir do 90º dia de gestação (Castilho et al., 2014). Nem todos os folículos ativados completam seu desenvolvimento até a ovulação, alguns deles podem vir a sofrer o processo de atresia durante as etapas seguintes da foliculogênese. Nos folículos primários uma única camada de células da granulosa com forma cuboide rodeia os ovócitos. No 150º dia de gestação os folículos secundários já estão presentes. São caracterizados por um ovócito rodeado por duas ou mais

camadas de células da granulosa e início da formação da teca. Com a continuidade do desenvolvimento dos folículos, as células da granulosa começam a se diferenciar, passando a secretar substâncias que se acumulam nos espaços intercelulares, formando uma cavidade chamada antro. O desenvolvimento dos folículos desde a ativação até a formação inicial da cavidade antral é independente de FSH, apesar de ser responsivo á esse hormônio *in vitro* (Sun & Li, 2013). Na fase antral inicial o ovócito atinge em média 110 µm de diâmetro (Bessa et al., 2013).

A cavidade antral aumenta pelo acúmulo de líquido folicular, formado através do extravasamento de fluidos dos vasos sanguíneos e substâncias produzidas pelas células que compõem o folículo. O folículo aumenta de diâmetro e as células da granulosa se diferenciaram em células do *cumulus* (CCs), que estão ligadas ao ovócito, e em células da granulosa mural que formam a parede do folículo e estão separadas das células da teca por uma membrana basal. A proliferação e a diferenciação das células da granulosa são controladas tanto por fatores de crescimento secretados pelo ovócito (Gilchrist et al., 2008), como por células somáticas (Gilchrist et al., 2004) e por hormônios (Gutierrez et al., 1997; Hunter et al., 2004). Os folículos terciários ou antrais podem ser observados a partir do 210º dia de gestação (Castilho et al., 2014), são constituídos por um ovócito circundado pelas CCs, cavidade antral desenvolvida e duas camadas de células da teca.

A partir de 3 mm de diâmetro, em bovinos, o desenvolvimento dos folículos é dependente de gonadotrofinas. Na fase final do desenvolvimento, os folículos antrais saudáveis são recrutados durante as ondas foliculares (Fortune, 1988), sendo esse recrutamento dependente de elevação na produção de FSH. Após o recrutamento, durante a fase de seleção, ocorrem eventos bioquímicos intrafoliculares que irão assegurar a dominância de apenas um folículo (Ginther et al., 2003). Nessa fase, a concentração de FSH diminui progressivamente enquanto a de LH é elevada. O folículo maior e mais desenvolvido passa a exercer dominância sobre os demais. Essa seleção é determinada por vários fatores intrafoliculares como: concentração de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e estradiol no líquido folicular e quantidade de receptores de LH nas células da granulosa e teca (Beg & Ginther, 2006). O folículo maior continua a crescer e a secretar estradiol e inibina, que faz *feedback* negativo na secreção de FSH. A diminuição na concentração desse hormônio causará a atresia dos demais folículos (Mihm & Austin, 2002). O ovócito incluso em um folículo pré-ovulatório, já completou seu crescimento e possui cerca de 130 µm de diâmetro (Bessa et al., 2013). Sob o estímulo de um pico de LH, na fase púbere, as células somáticas liberam sinais celulares para o ovócito, que sofre o processo de maturação, retoma

o ciclo meiótico e finalmente é liberado no processo de ovulação (Park et al., 2004; Ashkenazi et al., 2014).

2.2 Maturação ovocitária

A maturação ovocitária envolve uma série de eventos que iniciam no período pré-ovulatório e termina um pouco antes da ovulação. Pode ser dividida para fins didáticos em maturação nuclear e citoplasmática que, apesar de serem dois processos distintos, são interdependentes (Ferreira et al., 2009). Já a competência ovocitária, condição indispensável para que ovócito possa sofrer uma maturação completa, pode ser definida como a capacidade intrínseca do ovócito de se tornar apto a ser fecundado, clivar e gerar embrião viável (Zuccotti et al., 2011).

Essa competência é progressivamente adquirida durante a ovogênese/foliculogênese, através de várias mudanças estruturais e moleculares. Dentre essas mudanças, pode-se mencionar o remodelamento dinâmico da cromatina dentro do núcleo do ovócito, que ocorre na fase final de diferenciação, antes da retomada da meiose. A transição estrutural em larga-escala da cromatina, em bovinos, é essencial para que ovócitos em crescimento adquiram competência (Luciano et al., 2011). Esse processo é diretamente influenciado pela comunicação, via Junções Gap (JG), entre as CCs e o ovócito (Lodde et al., 2007). Outros processos importantes, são as modificações moleculares que consistem na transcrição, estocagem e processamento de mRNA que será utilizado até a transição materno-zigótica (Graf et al., 2014)

A maturação nuclear se refere à progressão da meiose do estágio de prófase I (PI) até atingir a metáfase II (MII). Durante todo o período de desenvolvimento folicular os ovócitos ficam retidos no estágio de diplóteno da prófase da primeira divisão meiótica, com o núcleo em Vesícula Germinativa (GV). A GV é caracterizada pela membrana nuclear íntegra e cromatina descondensada (Liu et al., 2006). O processo de maturação nuclear é iniciado com a quebra da vesícula germinativa (GVBD - do inglês, *germinal vesicle break down*), que é caracterizada pela condensação dos cromossomos e fragmentação da membrana nuclear, marcando o final da PI. Rapidamente os ovócitos progridem pelos estádios de metáfase I (MI), anáfase I (AI) e telófase I (TI), completando a primeira divisão meiótica. Nessa fase, os cromossomos homólogos são divididos, sendo que metade permanece no ovócito (célula

haploide) e a outra metade é liberada no primeiro corpúsculo polar. O final da maturação nuclear, com o ovócito retido em MII, pode ser então caracterizado pela formação da placa metafásica e extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP). A segunda divisão celular só se completa naturalmente com a fecundação.

O principal fator para a manutenção da retenção do ovócito no estágio de VG é a alta concentração de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) intraovocitária (Luciano et al., 2011). Sua concentração é regulada por duas enzimas principais: as adenilato ciclases (ACs) e as fosfodiesterases (PDEs), as quais são responsáveis pela síntese e degradação do cAMP respectivamente. Existem vários tipos de fosfodiesterases, a PDE tipo 3, em bovinos, é específica do ovócito, enquanto a PDE tipo 4 está envolvida no metabolismo de cAMP nas células somáticas (Tsafiriri et al., 1996). Além de cAMP, as células da granulosa também produzem outras substâncias regulatórias como o monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), um inibidor das PDEs ovocitárias transportado via JG (Schwarz et al., 2014).

Os altos níveis de cAMP no ovócito suprimem a atividade do fator promotor da maturação (MPF) através de um mecanismo dependente da proteína quinase A (PKA). O MPF é um heterodímero formado por duas subunidades, uma regulatória, a ciclina B, e uma catalítica, a p34cdc2, que é uma proteína dependente de ciclina (Cdk1). A desfosforilação que ativa o MPF e induz a retomada da meiose, é desencadeada por uma queda na concentração de cAMP intraovocitário (Tripathi et al., 2010).

Mesmo com a meiose bloqueada durante o crescimento folicular, a cromatina passa por modificações estruturais sucessivas, permitindo ao estágio GV ser classificado de acordo com o grau de condensação em: GV0, GV1, GV2 e GV3, sendo GV0 o menos condensado e GV3 o mais condensado (Tan et al., 2009). Essas mudanças, associadas com outras alterações bioquímicas, são cruciais para a aquisição de competência meiótica e de desenvolvimento (Lodde et al., 2007). Folículos maiores geralmente têm ovócitos maiores, com graus mais avançados de condensação de cromatina e mais competentes. Como na maioria das TRAs são retirados ovócitos de folículos antrais de vários diâmetros, os ovócitos são heterogêneos, com diferentes configurações de cromatina e conseqüentemente diferentes competências em se tornar embrião. *In vitro*, a condensação da cromatina é iniciada logo após a retirada dos complexo-*cumulus*-ovócitos (CCOs) do ambiente folicular, portanto, o tempo para essas modificações estruturais é diminuído quando comparado ao *in vivo*. O cultivo de ovócitos oriundos de folículos pequenos (0,5-2 mm) com substâncias que bloqueiam a retomada da meiose, mantendo as JG e permitindo o remodelamento da cromatina, dá ao

ovócito um tempo adicional para completar o seu crescimento e melhorar o desenvolvimento embrionário subsequente (Luciano et al., 2011).

A maturação citoplasmática compreende as mudanças estruturais e moleculares que ocorrem no citoplasma do ovócito desde o estágio de GV até MII (Ferreira et al., 2009). Durante esse período os ovócitos acumulam mRNA, proteínas e aminoácidos, dentre outras moléculas importantes que fazem parte do processo de maturação molecular. As CCs têm papel fundamental nesse processo, já que mantêm uma comunicação bidirecional com o ovócito e permitem a troca de pequenas moléculas incluindo ATP, íons, além de suprirem uma parte do requerimento energético através do metabolismo de lipídeos e glicose (Auclair et al., 2013). Além disso, também influenciam diretamente no acúmulo de mRNA, que são transportadas através das JG, como recentemente relatado por Macaulay et al. (2014). Essas moléculas são fundamentais para a aquisição de competência e conduzirão as primeiras divisões celulares após a fecundação. A atividade transcricional, ou seja, a produção de mRNA, diminui com a progressão da configuração da cromatina até que ocorra o silenciamento genômico na fase final de crescimento do folículo (Lodde et al., 2008). Esse silenciamento permanece até o embrião atingir o estágio de 8-16 células, quando passa a utilizar o seu próprio genoma (Graf et al., 2014).

Na maturação citoplasmática, além da maturação molecular, ocorre a reorganização de organelas, que é mediada pelos microtúbulos e microfilamentos do citoesqueleto. As mitocôndrias, que são organelas responsáveis pela produção de ATP, são deslocadas para áreas de maior gasto energético. O padrão de atividade mitocondrial ovocitária varia durante a maturação com o grau de competência meiótica, de acordo com o tamanho do folículo e o grau de atresia folicular (Jeseta et al., 2014). O complexo de Golgi, que inicialmente se localizava em uma área periférica no ovócito imaturo, é posicionado em uma área perinuclear. Os grânulos corticais, produtos do complexo de Golgi, e que se localizavam inicialmente na região central do ovócito durante o processo de maturação, migram para a periferia do mesmo, ancorando na membrana citoplasmática. Após o estímulo causado pela entrada do espermatozoide na fecundação, os grânulos corticais se fundem com a membrana plasmática e liberam seu conteúdo no espaço perivitelínico, provocando mudanças estruturais na zona pelúcida (ZP) que irão impedir a poliespermia (Hosoe & Shioya, 1997).

In vivo, somente após o pico de LH, o ovócito é estimulado a retomar a meiose e sofrer o processo de maturação. O estímulo causado pelo LH é mediado por fatores de crescimento da família do Fator de Crescimento Epidermal (EGFs), como ampiegulina

(AREG), epirregulina (EREG) e betacelulina (BTC), expressos rápida e transitoriamente pelas células da teca e da granulosa mural (Park et al., 2004). Esses fatores, por via parácrina, ligam-se a receptores EGF (EGFR) nas células da granulosa e do *cumulus* e induzem a maturação do CCO (Conti et al., 2014). Os EGF estimulam a expansão das CCs através da expressão de genes relacionados à produção de ácido hialurônico, componente da matriz extracelular (Richards, 2005). A expansão das CCs é essencial para o processo de ovulação, podendo ser induzida por FSH ou por EGFs *in vitro* e ocorre independente da maturação nuclear (Sirard et al., 2007; Zhang et al., 2009; Ashkenazi et al., 2014). Simultaneamente à expansão, ocorre a ruptura das JG entre o ovócito e as CCs, resultando na queda da transferência de cAMP, provocando um rápido declínio nos seus níveis dentro do ovócito, que induzirá a ativação do MPF (Tripathi et al., 2010). *In vitro*, a retomada de meiose é iniciada logo depois da retirada do ovócito do ambiente folicular e é chamada de retomada espontânea da meiose.

2.3 Controle da maturação: manutenção e retomada da meiose

O ovócito permanece retido em prófase I durante todo o crescimento folicular até que ocorra o estímulo do LH *in vivo*, ou até ser retirado do ambiente folicular, o que provoca a retomada espontânea da meiose *in vitro*. A permanência do ovócito em prófase I é regulada pela concentração intraovocitária de cAMP (Thripati et al., 2010). Altas concentrações mantêm a retenção e a redução nos níveis de cAMP está associada ao reinício da meiose. A concentração de cAMP intraovocitário é regulada pelo equilíbrio entre a atividade de duas enzimas: ACs e PDEs, que são responsáveis pela síntese e degradação do cAMP, respectivamente.

O cAMP que mantém a retenção é produzido pelo ovócito e pelas células foliculares, envolvendo vários mecanismos regulatórios (Tsafiriri et al., 1996). Ele é produzido pelas ACs a partir de ATP. A atividade das ACs é estimulada pela a ativação de receptores associados a proteína G (GPCRs), presentes na membrana do ovócito e das células foliculares (Mehlmann et al., 2004). O cAMP produzido nas células da granulosa é transferido para o ovócito através das JG e é continuamente degradado por hidrólise pelas PDEs. Existem vários tipos de PDEs, as PDEs tipo 3 são específicas do ovócito, enquanto as PDEs tipo 4 estão presentes nas células foliculares (Tsafiriri et al., 1996). A utilização de inibidores das PDEs

mantém o nível de cAMP alto, inibindo a retomada espontânea da meiose *in vitro* em camundongos (Vanhoutte et al., 2008), suínos (Dieci et al., 2013), ovinos (Rose et al., 2013) bovinos (Thomas et al., 2004) e humanos (Vanhoutte et al., 2007), demonstrando a importância do controle da degradação do cAMP na retomada da meiose.

Outro fator que também está envolvido no nível de cAMP dentro do ovócito é o Guanosina Monofostato Cíclico (cGMP), produzido nas células somáticas e transportado ao ovócito através das JGs. O cGMP é um inibidor de PDE tipo 3 produzido através do estímulo da enzima Guanilato Ciclase (GC), a qual é regulada por Óxido Nítrico (NO) (Schwarz et al., 2014). O transporte contínuo de cGMP pelas JG ao ovócito contribui para manter os altos níveis de cAMP, que mantém a PKA fosforilada e ativa, suprimindo a atividade do MPF.

O MPF é um heterodímero formado por duas subunidades: uma regulatória, a ciclina B, e uma catalítica, a Cdc2, que é uma proteína-quinase dependente de ciclina (Cdk1). A PKA regula proteínas que controlam a Cdk1: a fosfatase Cdc25 e a Wee1B/Myt1. Os altos níveis de cAMP intraovocitário resultam na fosforilação, catalisada pela Wee1B/Myt1, dos resíduos treonina 14 e tirosina 15 da Cdk1. Essa reação inibitória mantém o ovócito retido em MI. A defosforilação da Cdk1, que permite a progressão da meiose, é dependente da fosfatase Cdc25. A forma ativa do MPF envolve a defosforilação da Cdk1 e a sua associação com a ciclina B. Outro mecanismo de manutenção do bloqueio meiótico é através da regulação dos níveis de ciclina B. Ela é acumulada em ovócitos retidos pela inibição do complexo promotor da anáfase/ciclossomo (APC/C). O estímulo do LH provoca a destruição do inibidor do APC/C e a retomada da meiose (Tripathi et al., 2010).

A saída do bloqueio meiótico é desencadeada por uma queda na concentração de cAMP intraovocitário. *In vivo*, o LH se liga a seu receptor presente nas células da teca e da granulosa mural e inicia uma via de sinalização envolvendo cGMP e cAMP como segundos mensageiros, que induz a produção de fatores de crescimento da família do EGF: AREG, EREG e BTC. Esses fatores se ligam aos seus receptores EGFRs nas CCs e induzem a atividade da MAPK. As MAPKs ativadas interrompem as JG através da fosforilação da conexina 43 e, conseqüentemente, resulta na queda da transferência de cAMP e cGMP ao ovócito. A redução do nível de GMPc ativa a PDE3, que reduz ainda mais o nível de cAMP através de hidrólise. A redução do nível de cAMP intraovocitário diminui a atividade da PKA. Com isso, a fosfatase Cdc25 não é mais fosforilada e se torna ativada. A Wee1B/Myt1 então é defosforilada e se torna inativa. A Cdc25 ativa provoca a defosforilação dos resíduos treonina 14 e tirosina 15 da Cdk1, que eram mantidos pela Wee1B. Resultando finalmente na ativação do MPF e no reinício da meiose.

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) também estão envolvidas na progressão da meiose (Liang et al., 2007). Embora não sejam responsáveis diretas pela regulação da retomada dentro ovócitos, a indução da retomada por FSH, LH e EGF nas células somáticas é mediada por um mecanismo dependente de MAPK (Zhang et al., 2009). Elas são ativadas por sinais extracelulares e apresentam aumento gradual da sua atividade durante a maturação. São ativadas pela fosforilação dos resíduos de tirosina e treonina pela proteína quinase ativadora da MAPK (MEK). A inibição da ativação das MAPK inibe a VGBD através do bloqueio da quebra das JG, além disso, diminui a expressão de genes relacionados à produção de prostaglandinas e ácido hialurônico, que são genes chaves no processo de maturação (Liang et al., 2007).

A retomada espontânea da meiose *in vitro* causa uma prematura quebra das JG, levando a perda de substâncias benéficas produzidas pelas CCs. Ela pode ser prevenida por vários tipos de inibidores que promovem manutenção da concentração de cAMP intraovocitário ou permitem a manipulação da atividade do MPF (Gilchrist & Thompson, 2007). A modulação dos níveis de cAMP pode ser realizada com a utilização de análogos do cAMP, como o dibutyryl-cAMP, por inibidores específicos de PDEs, como Cilostamida, Milrinone (PDE-3) e Rolipram (PDE-4) e inibidores inespecíficos como 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX). A manipulação da atividade do MPF pode ser feita por inibidores da Cdk, como Butirolactona e Roscovitina e por estimuladores das ACs, como o Forskolin (REF).

A manutenção do bloqueio com moduladores do cAMP é acompanhada por outros efeitos além da manutenção do ovócito em VG, como o prolongamento do tempo de viabilidade das JG (Thomas et al., 2004; Shu et al., 2008), o atraso na remodelação em larga escala da cromatina (Dieci et al., 2013; Lodde et al., 2013), a habilidade em retomar a meiose (Nogueira et al., 2006) e no metabolismo tanto das CCs, como dos ovócitos (Zeng et al., 2014). Essas modificações podem interferir de modo significativo na competência do ovócito, promovendo benefícios, dependendo da espécie, do tamanho de folículos utilizados, do tempo de pré-maturação, da concentração e dos tipos de inibidores.

Baseado nesses conhecimentos foi proposto um novo sistema de maturação que seria considerado mais fisiológico, o SPOM (derivado do inglês: *simulated physiological oocyte maturation*) (Albuz et al., 2010). Nesse sistema, a pré-MIV é realizada por apenas 2 horas usando moduladores do cAMP (IBMX + FSK) e, posteriormente os CCOs são maturados por 30 horas na presença de Cilostamida e FSH. Os autores relataram um aumento na taxa e na qualidade dos embriões bovinos. Entretanto, outro estudo utilizando esse sistema

não confirmou o seu efeito benéfico na PIVE (Guimarães et al., 2014). Em bovinos, a maioria dos estudos que mostram resultados benéficos usando um tempo de pré-MIV é observado em ovócitos oriundos de folículos antrais iniciais, ou seja, com baixa capacidade de desenvolvimento (Huang et al., 2013, 2014; Luciano et al., 2011). Porém, o uso de IBMX em ovócitos oriundos de folículos médios (2-6 mm) em um tempo de pré-maturação de 22 horas, seguido de MIV por mais 24 horas (Lodde et al., 2013), não aumentou o número, mas melhorou a qualidade dos embriões. Em ovócitos de humanos, o uso da pré-MIV com moduladores de cAMP também tem mostrado poucos benefícios (Nogueira et al., 2006; Shu et al., 2008).

Apesar da maioria dos estudos utilizando inibidores mostrarem que é possível bloquear a retomada da meiose por até 24 horas antes da maturação e fecundação *in vitro*, (Dode & Adona, 2001; Adona & Leal, 2004; Gilchrist & Thompson, 2007), os resultados obtidos mostram não haver um incremento na produção de embriões. Mesmo não tendo incremento na produção embrionária, o fato de retardar a maturação tem grande aplicabilidade no uso de técnicas de reprodução assistida.

2.4 Papel dos fatores de crescimento na MIV

O ambiente de maturação afeta diretamente a competência ovocitária (Wrenzycki & Stinshoff, 2013). Fatores como: hormônios, antioxidantes, fatores de crescimento, temperatura, atmosfera gasosa e suplementação energética, são estudados e modificados na tentativa de mimetizar ao máximo o ambiente folicular e, assim, dar condições ao ovócito de expressar todo o seu potencial (competência ovocitária). Como cada ovócito é oriundo de um ambiente folicular único, conseqüentemente, o requerimento para o seu desenvolvimento é dependente do estágio fisiológico do folículo do qual foi retirado e, ao serem submetidos a MIV, todos compartilham as mesmas condições ambientais. Portanto, o insucesso da MIV está ligado às diferenças entre a composição do meio de cultivo *in vitro*, comparado com o ambiente folicular *in vivo*, além da qualidade intrínseca do ovócito.

Nesse contexto, surgem os fatores de crescimento, que são proteínas produzidas por células e atuam como mediadores parácrinos ou autócrinos, estimulando ou inibindo as mais diversas reações celulares como: multiplicação, diferenciação, sobrevivência e apoptose (Chaves et al., 2010; Agha et al., 2012; Portela et al., 2014). Existem dois modos

de suplementar o meio MIV com fatores de crescimento: através de cocultivo com CCOs, CCs ou ovócitos desnudos e através da adição de fatores sintetizados em laboratório. Vários benefícios aos ovócitos já foram relatados utilizando tanto o cocultivo como os fatores sintéticos durante a MIV (Luciano et al., 2005; Gilchrist et al., 2008; ; Zhang et al., 2010; Caixeta et al., 2013; Sugimura et al., 2014). Portanto, infere-se que o microambiente promovido durante a MIV convencional , não favorece a produção suficiente de fatores de crescimento pelos CCOs para uma boa maturação ovocitária.

No folículo, existem fatores secretados pelas células somáticas e por ovócitos (OSFs do inglês: *oocyte secreted factors*). Eles regulam algumas reações celulares dentro do folículo como, por exemplo: crescimento do ovócito (Van den Hurk & Zhao, 2005), diferenciação das células da granulosa (Spicer et al., 2008), ovulação (Ashkenazi et al., 2014) e luteinização (Richards et al., 1998).

Os fatores de Crescimento de Fibroblasto (FGFs) controlam vários aspectos da fisiologia de embriões, fetos e adultos de várias espécies (Chen et al., 2000; Zhong et al., 2006; Fields et al., 2011; Agha et al., 2014). São importantes fatores de crescimento que atuam desde a formação inicial das células reprodutivas (Castilho et al., 2014), até a atresia (Portela et al., 2014) ou ovulação e formação do corpo lúteo (Castilho et al., 2008). Evidências mostram que vários FGFs interagem entre as células que compõem o folículo, regulando foliculogênese e ovogênese (Gasperin et al., 2012; Castilho et al., 2014; Portela et al., 2014).

Os FGFs podem ser agrupados em sete subfamílias de acordo com suas similaridades estruturais: subfamília do FGF1 (FGF1 e 2), subfamília do FGF4 (FGF4, 5 e 6), subfamília do FGF7 (FGF3, 7, 10 e 22), subfamília do FGF9 (FGF9, 16 e 20), subfamília do FGF8 (FGF8, 17 e 18), subfamília do FGF19 (FGF19, 21 e 23) e subfamília do FGF11 (FGF11, 12, 13 e 14) (Itoh and Ornitz, 2004).

A ação biológica dos FGFs se dá pela ligação e ativação de receptores transmembrana ligados a um domínio tirosina-quinase intracelular, chamados FGFRs (Eswarakumar et al., 2005). Existem 4 tipos de receptores: FGFR 1,2,3 e 4. Os diferentes arranjos extracelulares dos receptores 1, 2 e 3 geram diferentes isoformas (b e c) com diferentes graus de afinidades pelos 23 tipos conhecidos de FGFs em mamíferos (Itoh & Ornitz, 2004). A interação com os seus receptores é coordenada pela conjugação com heparina ou proteoglicanos heparan sulfatos, que conferem maior estabilidade à ligação. A sinalização é feita após a ligação dos FGFs aos domínios extracelulares, que se propaga

dentro da célula após a fosforilação do domínio tirosina-quinase, gerando vários padrões de transdução intracitoplasmáticos (Dailey et al., 2005).

O FGF10 é uma proteína de 13,9-KD, também conhecido como fator de crescimento de queratinócito – 2 (KGF-2). Ele se assemelha bastante ao FGF7 tanto em estrutura, quanto em função (Igarashi et al., 1998). O mRNA e a proteína codificada pelo gene FGF10 foram detectados em ovócitos de folículos pré-antrais e antrais e nas células da teca de bovinos (Buratini et al., 2007). Ele também já foi encontrado em útero de ovinos (Chen et al., 2000) e em ovários de bovinos e humanos (Buratini et al., 2007; Oron et al., 2012). Durante a embriogênese, a ação de FGF10 no ovário de fetos bovinos pode influenciar a formação de folículos primordiais, principalmente através FGFR2B, enquanto o FGFR1B é mais importante para a ativação e desenvolvimento dos folículos pré-antrais (Castilho et al., 2014). Em caprinos, o FGF10 promoveu o crescimento e a sobrevivência de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* (Chaves et al., 2010)

Os dois principais receptores para FGF10 são o FGFR1B e o 2B. O FGFR2B é mais prevalente no ovócito, já o principal receptor, o FGFR1B, é mais expresso nas CCs (Zhang et al., 2010). Ele é regulado por FSH, indicando que o mesmo deve ter um papel importante na maturação ovocitária (Zhang & Ealy, 2012; Caixeta et al, 2013). O aumento do FSH que antecede uma onda de crescimento folicular aumenta a expressão FGFR1B nas células da granulosa, o que aumenta a resposta ao FGF10 secretado. A ação de FGF10 nesta fase é, provavelmente, para inibir a diferenciação de células da granulosa, o qual se reflete pela menor secreção de estradiol, que é um importante marcador de diferenciação. À medida que o folículo se desenvolve, existe uma diminuição progressiva na expressão de FGF10 pela teca, o que permite o aumento da secreção de estradiol e a diferenciação de células da granulosa (Buratini et al., 2007).

Além da sua importância na foliculogênese, descrita por diversos grupos de pesquisa, já foram relatados efeitos benéficos durante a MIV por Zhang et al. (2010) e Pomini Pinto et al., (2014). Esses estudos mostraram que a suplementação de FGF10 durante a MIV pode afetar a progressão da meiose de modo dose dependente. Zhang et al., (2010) mostraram que a suplementação com 50 ng/ml acelera a condensação da cromatina às 6 horas de MIV e aumenta a taxa de ovócitos em TI/MII após 22 horas, enquanto 0,5 ng/ml ou 5 ng/ml não altera a maturação nuclear. Pomini et al. (2014), observaram um aumento na porcentagem de ovócitos com o primeiro corpúsculo polar extruso após 22 horas de MIV com a adição de 2,5 ng/ml, quando comparado ao controle, 10 e 50 ng/ml de FGF10.

Zhang et al. (2010) observaram que o FGF10, quando adicionado na MIV na concentração de 0,5 ng/ml promove um aumento na expansão das CCs e no desenvolvimento embrionário. No mesmo trabalho, foi visto um efeito negativo do aumento da concentração até 50 ng/ml. Recentemente, Pomini Pinto et al. (2014), testaram várias concentrações de FGF10 durante a MIV por 22 horas e não observaram incremento na produção embrionária, mas outros efeitos benéficos, tais como, o aumento da taxa de ovócitos com CP quando adicionou 2,5ng/ml. Esses autores também observaram menores taxas de ovócitos apoptóticos, determinadas pela técnica de TUNEL, quando 10 e 50 ng/ml de FGF10 foram adicionadas ao meios. Além disso, a adição de 50 ng/ml teve uma tendência em aumentar a abundância relativa de mRNA para COX2 e PLAC8, enquanto a adição de 10 ng/ml tendeu em aumentar CDX2. Caixeta et al. (2013) também relataram melhoria na expansão de CCOs bovinos com a dose de 10 ng/ml e não com 50 ng/ml. Fato também observado com BMP15, porém não houve efeito sinérgico quando os dois foram adicionados simultaneamente. Essa melhoria na expansão foi relacionada a um aumento na captação de glicose. Outra correlação de efeito com esse fator foi relatada por Zhang et al. (2010), que associa o incremento na produção embrionária à maior expressão de BMP15 nos ovócitos, provocada pela adição de FGF10 na MIV

Considerando a importância do FGF10 na regulação da foliculogênese e seus diversos efeitos durante a MIV, mais estudos tornam-se necessários para esclarecer os mecanismos pelos quais esse fator de crescimento age.

2.5 Expressão de genes selecionados

Além da avaliação morfológica do embrião para determinar sua qualidade, a análise de expressão de genes é uma ferramenta importante para qualificar os embriões em diferentes estágios de desenvolvimento (Pomar et al., 2005). Vários genes já foram identificados e vem sendo utilizados como relacionados com a qualidade dos embriões em bovinos (Rizos et al., 2002; Gutiérrez-Adán et al., 2004; Lonergan et al., 2006; Orozco-lucero et al., 2014)

O gene placenta-específico 8 (PLAC8), também chamado de Onzin ou C15, codifica uma proteína de 12.5 KDa com 112 aminoácidos, rica em cisteína. O nome do gene PLAC8 foi dado porque a proteína foi encontrada primeiramente na camada espongiotrofoblasto da placenta de mamíferos (Galaviz-hernandez et al., 2003). Esse gene está envolvido no controle da formação da gordura branca e marrom em camundongos

(Jimenez-preitner et al., 2012). A sua inativação implica em problemas na termorregulação e no controle da obesidade (Jimenez-preitner et al., 2011). Além disso, em camundongos, é expressa em altos níveis nas células epiteliais do trato intestinal, no pulmão e em células do sistema imune incluindo macrófagos e granulócitos. A inativação do PLAC8 reduz a capacidade de fagocitar bactérias pelos neutrófilos, ou seja, diminui a imunidade inata (Ledford et al., 2007). O gene também está associado ao câncer em humanos (Mourtada-maarabouni et al., 2013; Li et al., 2014).

Em plantas, existem famílias de proteínas com similaridades estruturais a PLAC8 que estão envolvidas na determinação do tamanho do fruto (Libault et al., 2010). Em animais domésticos, o gene PLAC8 ainda não tem sua função bem estabelecida, mas sabe-se que sua expressão está relacionada com o desenvolvimento da placenta (Galaviz-Hernandez et al. 2003; Klein et al., 2006) e exerce um papel na comunicação materno fetal (Gómez et al., 2009). Uma alta expressão desse gene foi relatada em blastocistos bovinos que tiveram sucesso na prenhez quando comparados com aqueles que foram reabsorvidos (El-Sayed et al., 2006) e no endométrio de vacas prenhes em relação as não prenhes (Klein et al. 2006). Na PIVE bovina, o PLAC8 é um gene utilizado como marcador de qualidade embrionária (Gómez et al., 2009; Machado et al., 2011; Goovaerts et al., 2011). A suplementação do meio de maturação com 50 ng/ml de FGF10 teve uma tendência em aumentar a abundância relativa de mRNA para PLAC8 em embriões no D8 (Pomini Pinto et al., 2014).

A glicoproteína transmembrana CD9 (CD9) é membro da superfamília das tetraspanins, também chamada transmembrana 4 (TM4SF). Muitos membros da TM4SF estão envolvidos na proliferação e diferenciação celular, adesão, motilidade e câncer (Todd & Maecker, 1997). Em bovinos, é encontrada na superfície da membrana plasmática de ovócitos e está envolvida na interação entre o espermatozoide e o ovócito no processo de fertilização (Zhou et al., 2009). Além disso, microvesículas contendo CD9 mediam a transferência de moléculas para espermatozoides bovinos durante a maturação epididimal (Sullivan et al., 2013). A sua deficiência ou bloqueio causa redução da fertilidade em ratos devido à incapacidade de fusão dos gametas (Naour et al., 2000). Uma das razões para a baixa viabilidade de ovócitos vitrificados é a diminuição na expressão do mRNA e destruição da proteína CD9 (Zhou et al., 2013). O gene CD9 também é expresso em blastocistos e células epiteliais do endométrio em células binucleadas do trofoblasto em bovinos (Liu et al., 2006; Xiang and Maclaren, 2002), sugerindo um papel importante no processo de placentação. Foi sugerido que seu papel poderia ser na inibição da implantação, pois estava super expressa em biopsias obtidas de blastocistos que não resultaram em prenhez comparado com as que

resultaram em prenhez (El-Sayed et al., 2006). Esses autores também sugeriram que, devido às similaridades entre a embriogênese e o câncer, esse gene pode estar relacionado com processo invasivo do embrião.

A proteína queratina 8 (KRT8), pertence a um grupo de queratinas que são proteínas componentes dos filamentos intermediários predominantes nas células epiteliais. Elas promovem estabilidade mecânica às células, porém são estruturas dinâmicas capazes de responder rapidamente a estímulos celulares (revisado por Magin et al., 2007). Elas são expressas em pares distintos dependendo do estágio de diferenciação celular. A k8 e a k18 são as primeiras proteínas expressas em embriões (Jackson et al., 1980), e são relacionadas à progressão do câncer de mama e constituem promotores chave na integridade do epitélio do Timo (Iyer et al., 2013; Odaka et al., 2013). Elas são envolvidas na proteção a vários tipos de estresse (Toivola et al., 2011). A k8 modula a função de mitocôndrias em hepatócitos podendo predispor-los a apoptose e injúrias oxidativas (Tao et al., 2009) e está ligada a resposta ao estresse induzido por diabetes em células β do pâncreas (Tao et al., 2009). Além disso, o KRT8 tem um papel importante na formação do blastocisto e na sua subsequente implantação, pois é responsável pela formação do citoesqueleto no trofoectoderma. A expressão desse gene apresentou altos níveis na fase de blastocisto bovino estando com baixa expressão nos embriões com 2 células e mórulas (El-Halawany et al., 2005).

A expressão de KRT8 também foi avaliada em embriões PIV no dia 14 de desenvolvimento, sendo relatada uma superexpressão desse gene em embriões fêmeas comparados aos machos (Machado et al., 2011). A proteína KRT8 é crítica para o desenvolvimento de embriões pós-eclosão (Maddox-Hyttel et al. 2003) e sua deficiência está associada com a morte de embriões de camundongo (Jaquemar et al. 2003). A baixa expressão desse gene também foi relatada em embriões oriundos de transferência nuclear (TN) quando comparados com embriões PIV (Pfister-Genskow et al., 2005). Já as biópsias de embriões do grupo que resultou em reabsorção no início da gestação, apresentaram níveis elevados desse gene. Entretanto, outros estudos comparando embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* não detectaram expressão diferencial do KRT8 nem em embriões de D7 nem de D14 (Machado et al., 2011).

A glicoproteína associada à prenhez-2 (PAG2) faz parte do grupo das glicoproteínas associadas a prenhez (PAGs), que constituem uma superfamília multigênica de proteinases aspárticas (Xie et al., 1997). São expressas em trofoblasto pré-placentário e após a implantação no epitélio coriônico de diversos tipos de placenta. Possuem elevada relevância científica e biológica devido à sua aplicação na detecção de prenhez de animais domésticos e

selvagens (Szafranska et al., 2006). Em *Bos taurus*, sua família possui 21 membros que podem ser separados em grupos filogenéticos antigos e modernos. A imuno-histoquímica mostrou que PAGs são produzidas por populações celulares específicas, sugerindo funções biológicas distintas dentro dos tecidos placentários (Touzard et al., 2013). A concentração sérica de PAG1 tem sido usada como marcador da interação feto-útero para o diagnóstico de prenhez (Green et al., 2005), e sua queda pode ser preditiva de aborto (Garcia et al., 2013).

As pequenas proteínas de choque térmico (sHSP) são importantes componentes da maquinária das chaperonas (Basha et al., 2006). São expressas em todos os vertebrados e desenvolvem diversas funções em vários tipos de tecidos em fases específicas do desenvolvimento e diferenciação ou induzidas por estresses ambientais (Franck et al., 2004). Elas estão implicadas no aumento da resistência celular ao estresse, na regulação da actina e na dinâmica dos filamentos intermediários (Toivola et al., 2011), inibição de apoptose (Wu et al., 2007) e desenvolvimento da placenta (Hemberger & Cross, 2001). Em particular, a *Heat shock 27kDa protein 1* (HSPB1 ou HSPB27) é superexpressa em vários tipos de câncer e promove a sobrevivência do tumor por meio de atividades anti-apoptóticas e pró-angiogênese (Fanelli et al., 1998; Rui et al., 2003). Em bovinos de corte da raça Nelore (*Bos indicus*) HSPB1 está relacionado à maciez da carne (Carvalho et al., 2014). A principal função da HSPB1 é promover termotolerância, crioproteção e auxiliar na sobrevivência celular sob condições de estresse. De fato, estudos recentes detectaram alteração na expressão desse gene em embriões vitrificados comparados com os embriões frescos (Leme 2015, dados não publicados).

A família das proteínas MutS estão envolvidas na reparação de DNA. As mutações nos genes que codificam essas proteínas aumentam a instabilidade genômica. Em humanos, estão implicadas na prevenção do desenvolvimento de câncer (Limburg et al., 2012). Elas funcionam como heterodímeros que reconhecem e ligam pares de bases de DNA incompatíveis, resultantes de erros na replicação de DNA ou de recombinação (Alani et al., 1995; Palombo et al., 1995). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* contém seis homólogos MutS, o MSH 2 a 6 codificam proteínas que agem na reparação de DNA nuclear. A especificidade de reconhecimento da incompatibilidade ocorre através da formação de complexos heterodiméricos distintos. Em ovócitos humanos, *mutS homolog 6* (MSH6) foi altamente expresso em relação a reparação de DNA danificado por espécies reativas de oxigênio (Menezes et al., 2007). Esse gene também foi menos expresso em embriões PIV vitrificados comparados com os frescos (Leme 2015, dados não publicados).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADONA, P.R.; LEAL, C. L. V.. Meiotic inhibition with different cyclin- dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. **Zygote**, v.12, p. 197-204, 2004.

AGHA, E. E.; ALAM, D. A.; CARRARO, G.; MACKENZIE, B.; GOTH, K., DE LANGHE, S. P.; VOSWINCKEL, R.; HAJIHOSSEINI, M. K.; REHAN, V. K.; BELLUSCI, S..Characterization of a Novel Fibroblast Growth Factor 10 (Fgf10) Knock-In Mouse Line to Target Mesenchymal Progenitors during Embryonic Development. **Plos one**, v. 7, n. 6, p. 3–10, 2012.

AGHA, E.E.; HEROLD, S.; ALAM, D. A.; QUANTIUS, J.; MACKENZIE, B.; CARRARO, G., MOISEENKO, A.; CHAO, C.; MINOO, P.; SEEGER, W.; BELLUSCI S..Fgf10 -positive cells represent a progenitor cell population during lung development and postnatally. **Development**, v. 141, p. 296–306, 2014.

ALANI, E.; CHI, N-W.; KOLODNER, R..The *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 protein specifically binds to duplex oligonucleotides containing mismatched DNA base pairs and insertions. **Genes Development**, v. 9, p. 234–247, 1995.

ALBUZ, F. K.; SASSEVILLE, M.; LANE, M.; ARMSTRONG, D.T.; THOMPSON, J.G.; GILCHRIST, R.B.. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction**, v. 25, n. 12, p. 2999–3011, 2010.

ASHKENAZI, H.; CAO, X.; MOTOLA, S.; POPLIKER, M.; CONTI, M.; TSAFRIRI, A.. Epidermal Growth Factor Family Members: Endogenous Mediators of the Ovulatory Response. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 77–84, 2014.

AUCLAIR, S.; UZBEKOV, R.; ELIS, S.; SANCHEZ, L.; KIREEV, I.; LARDIC, L.; DALBIES-TRAN, R.; UZBEKOVA, S.. Absence of cumulus cells during in vitro maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. **American journal of physiology endocrinology and metabolism**, v. 304, n. 6, p. 599–613, 2013.

BASHA, E.; FRIEDRICH, K. L.; VIERLING, E.. The N-terminal arm of small heat shock proteins is important for both chaperone activity and substrate specificity. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 52, p. 39943–52, 2006.

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

BESSA, I.R.; NISHIMURA, R.C.; FRANCO, M.M., DODE, M.A.N.. Transcription Profile of Candidate Genes for the Acquisition of Competence During Oocyte Growth in Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v 48, p. 781–789, 2013.

BURATINI, J.; PINTO, M. G. L.; CASTILHO, A. C.; AMORIM, R.L.; GIOMETTI, I.C.; PORTELA, V.M., NICOLA, E.S.; PRICE, C.A.. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. **Biology of reproduction**, v. 77, n. 4, p. 743–50, 2007.

BILODEAU-GOESEELS S.. Bovine Oocyte Meiotic Inhibition Before In Vitro Maturation and Its Value to In Vitro Embryo Production : Does it Improve Developmental Competence ? **Reproduction in domestic animals**, v. 47, p. 687–693, 2012.

CAIXETA, E. S.; SUTTON-MCDOWALL, M. L; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G.; CHRISTOPHER, A. P.; MACHADO, M. F.; LIMA, P. F.; BURATINI, J.. Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. **Reproduction**, v. 146, n. 1, p. 27–35, 2013.

CARVALHO, M. E.; GASPARIN, G.; POLETI, M. D.; ROSA, A. F.; BALIEIRO, J. C. C.; LABATE, C. A.; NASSU, R. T.; TULLIO, R. R.; REGITANO, L. C. A.; MOURÃO, G. B.; COUTINHO, L. L... Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nelore beef cattle , a *Bos indicus* breed. **Met science**, v. 96, n. 3, p. 1318–1324, 2014.

CASTILHO, A. C. S.; DA SILVA, R. B.; PRICE, C.; MACHADO, M.F.; AMORIM, R.L.; BURATINI, J.. Expression of fibroblast growth factor 10 and cognate receptors in the developing bovine ovary. **Theriogenology**, v. 81, n. 9, p. 1268–74, 2014.

CASTILHO, A. C. S.; GIOMETTI, I. C.; BERISHA, B.; SCHAMS, D., PRICE, C.A., AMORIM R.L.; PAPA, P.C.; BURATINI, JR J.. Expression of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in the bovine corpus luteum. **Molecular reproduction and development**, v. 75, n. 5, p. 940–5, 2008.

CHAVES, R. N.; LIMA-VERDE, I. B.; CELESTINO, J. J. H.; DUARTE, A.B.G.; ALVES, A.M.C.V.; MATOS, M.H.T.; CAMPELLO, C.C.; NAME, K.P.O.; BÃO, S.N.; BURATINI, J.; FIGUEIREDO, J.R.. Fibroblast growth factor-10 maintains the survival and promotes the growth of cultured goat preantral follicles. **Domestic animal endocrinology**, v. 39, n. 4, p. 249–58, 2010.

CHEN, C.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W.. Fibroblast Growth Factor-10: A Stromal Mediator of Epithelial Function in the Ovine Uterus. **Biology of reproduction**, v. 63, p. 959–966, 2000.

CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J.; SU, Y.. Role of the Epidermal Growth Factor Network in Ovarian Follicles. **Molecular endocrinology**. v. 20, n. December, p. 715–723, 2014.

DAILEY, L.; AMBROSETTI, D.; MANSUKHANI, A.; BASILICO, C.. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 16, p. 233–247, 2005.

DIECI, C.; LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; LAGUTINA, I.; TESSARO, I.; MODINA, S. C.; ALBERTINI, D. F.; LAZZARI, G.; GALLI, C.; LUCIANO, A. M..The effect of cilostamide on gap junction communication dynamics, chromatin remodeling, and competence acquisition in pig oocytes following parthenogenetic activation and nuclear transfer. **Biology of reproduction**, v. 89, n. 3, p. 68, 2013.

DODE, M.A.; 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.

EL-HALAWANY, N.; PONSUKSILI, S.; WIMMERS, K.; GILLES, M.; TESHAYE, D.; SCHELLANDER, K.. Quantitative expression analysis of blastocyst- derived gene transcripts in preimplantation developmental stages of in vitro-produced bovine embryos using real-time polymerase chain reaction technology. **Reproduction Fertility and Development**, v. 16, p.753–762, 2005.

EL-SAYED, A.; HOELKER, M.; RINGS, F.; SALILEW, D.; JENNEN, D.; THOLEN, E.; SIRARD, M. A.; SCHELLANDER, K.; TESHAYE, D.. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiological Genomics**, v. 28, p. 84– 96, 2006.

ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S.. The Role of the Oocyte in Folliculogenesis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 11, n. 5, 2000.

ESWARAKUMAR, V. P.; LAX, I.; SCHLESSINGER, J.. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. **Cytokine growth factor reviews**, v. 16, p. 139–149, 2005.

FANELLI, M. A.; CARIÓN, F. D.C.; DEKKER, J.; SHOEMAKER, J.; CIOCCA, D. R.. Serological Detection of Heat Shock Protein in Normal and Breast Cancer Patients. **Cancer epidemiology, biomarkers and prevention**, v. 7, p. 791–795, 1998.

FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S.. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836–48, 2009.

FIELDS, S. D.; HANSEN, P. J.; EALY, A. D.. Fibroblast growth factor requirements for in vitro development of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 75, n. 8, p. 1466–75, 2011.

FORTUNE, J. E.; SIROIS, J.. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of reproduction**, v. 39, p. 308–317, 1988.

FRANCK, E.; MADSEN, O.; RHEEDE, V. T.; RICARD, G.; HUYNEN, M. A.; JONG, W. W.. Evolutionary diversity of vertebrate small heat shock proteins. **Journal of molecular evolution**, v. 59, n. 6, p. 792–805, 2004.

GALAVIZ-HERNANDEZ, C.; STAGG, C.; RIDDER, G.; TANAKA, T. S., KO, M. S.H., SCHLESSINGER, D.; NAGARAJA, R.. Plac8 and Plac9 , novel placental-enriched genes identified through microarray analysis. **Gene**, v. 309, p. 81–89, 2003.

GARCIA-ISPIERTO, I.; ALMERIA, S.; SERRANO, B.; SOUSA, N.M., BECKERS, J.F.; LOPEZ-GATIUS F.. Plasma Concentrations of Pregnancy-Associated Glycoproteins Measured Using Anti-Bovine PAG-2 Antibodies on Day 120 of Gestation Predict Abortion in Dairy Cows Naturally Infected with *Neospora caninum*. **Reproduction in domestic animals**, v. 618, p. 613–618, 2013.

GASPERIN, B. G.; FERREIRA, R.; ROVANI, M. T.; SANTOS J. T.; BURATINI, J.; PRICE, C. A.; BAYARD, P. D. G.. FGF10 inhibits dominant follicle growth and estradiol secretion in vivo in cattle. **Reproduction**, v. 143, p. 815-823, 2012.

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

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

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

GINTHER, O.J.; BEG, M.a.; DONADEU, F.X.; *et al.* Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 239–257, 2003.

GOMEZ, E.; GUTIERREZ-ADAN, A.; DIEZ, C.; BERM-EJO ALVAREZ, P.; MUNOZ, M.; RODRIGUEZ, A.; OTERO, J.; ALVAREZ-VIEJO, M.; MARTIN, D.; CARROCERA, S.; CAAMANO, J.N.. Biological differences between in vitro produced bovine embryos and parthenotes. **Reproduction**, v. 137, p. 285–295, 2009.

GOOVAERTS, I.G.F.; LEROY, J.L.M.R.; RIZOS, D.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; JORSSSEN, E.P.A.; BOLS, P.E.J. Single in vitro bovine embryo production: Coculture with autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and gene expression profile. **Theriogenology**, v. 76, p. 1293–1303, 2011.

GUEMRA, S.; SILVA SANTO, E.; ZANIN, R.; MONZANIA, P. S., SOVERNIGO, T. C., OHASHI, O. M.; LEAL, C. L. V., ADONA P. R.. Effect of temporary meiosis block during prematuration of bovine cumulus-oocyte complexes on pregnancy rates in a commercial setting for in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 81, n. 7, p. 982–7, 2014.

GUIMARÃES, A. L. S.; PEREIRA S.A.; LEME, L.O.; DODE, M.A.N.. Theriogenology Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine in vitro embryo production, **Theriogenology**, v. 83, n. 1, p. 52–57, 2015.

GUTIERREZ, C. G.; CAMPBELL, B. K.; 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. 616, p. 608–616, 1997.

GUTIERREZ-ADAN, A.; RIZOS, D.; FAIR, T.; MOREIRA, P.N.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P.. Effect of Speed of Development on mRNA Expression Pattern in Early Bovine Embryos Cultured In Vivo or In Vitro. **Molecular reproduction and development**, v. 68, p. 441–448, 2004.

GRAF, A.; KREBS, S.; HEININEN-BROWN, M.; ZAKHARTCHENKOC, V.; BLUMA, H.; WOLF, E.. Genome activation in bovine embryos: review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. **Animal reproduction science**, v. 149, n. 1-2, p. 46–58, 2014.

GREEN, J.; PARKS, T. E.; AVALLE, M. P.; TELUGUA, B. P.; MCLAINA, A. L.; PETERSON, A. J.; MCMILLAN, W.; MATHIALAGAN, N.; HOOK, R. R.; XIE, S.; ROBERTS, R. M.. The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1481–503, 2005.

HEMBERGER, M.; CROSS, J. C.. Genes governing placental development. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 12, n. 4, p. 162–168, 2001.

HOSOE, M.; SHIOYA, Y.. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote**, v. 5, p. 371–6, 1997.

HUANG, W.; NAGANO, M.; KANG, S.; YANAGAWA, Y.; TAKAHASHI, Y.. Prematurational Culture with 3-Isobutyl-1-methylxanthine Synchronizes Meiotic Progression of the Germinal Vesicle Stage and Improves Nuclear Maturation and Embryonic Development in In Vitro -grown Bovine Oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 60, n. 1, p. 9-13, 2014.

HUANG, W.; NAGANO, M.; KANG, S.. Effects of in vitro growth culture duration and prematuration culture on maturational and developmental competences of bovine oocytes derived from early antral follicles. **Theriogenology**, v. 80, n. 7, p. 793–9, 2013.

HUNTER, M. G.; ROBINSON, R. S.; MANN, G. E.. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. **Animal reproduction science**, v. 82-83, p. 461–77, 2004.

IGARASHI, M.; FINCH, P. W.; AARONSON, S.A.. Characterization of Recombinant Human Fibroblast Growth Factor (FGF) -10 Reveals Functional Similarities with Characterization of Recombinant Human Fibroblast Growth Factor (FGF) -10 Reveals Functional Similarities with Keratinocyte Growth Factor (FGF-7). **The journal of biological chemistry**, v. 273, n. 21, p. 13230–35, 1998.

ITOH, N.; ORNITZ, D. M.. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. **Trends in genetics** v. 20, n. 11, p. 14–20, 2004.

IYER, S. V.; DANGE, P. P.; ALAM, H.. Understanding the Role of Keratins 8 and 18 in Neoplastic Potential of Breast Cancer Derived Cell Lines. **Plos one**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2013.

JACKSON, B.W.; GRUND, C.; SCHMID, E.; BURKI, K.; FRANKE, W.W.. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. Intermediate filaments of the cytokeratin type and desmosomes in preimplantation embryos. **Differentiation**, v.17, p. 161–179, 1980.

JAQUEMAR, D.; KUPRIYANOV, S.; WANKELL, M.; AVIS, J.; BENIRSCHKE, K.; BARIBAULT, H.; OSHIMA, R.G.. Keratin 8 protection of placental barrier function. **Journal Cell Biology**. v. 161, p. 749–56, 2003.

JESETA, M.; CTVRTLÍKOVÁ KNITLOVÁ, D.; HANZALOVÁ, K.. Mitochondrial patterns in bovine oocytes with different meiotic competence related to their in vitro maturation. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 49, n. 3, p. 469–75, 2014.

JIMENEZ-PREITNER, M.; BERNEY, X.; THORENS, B.. Plac8 is required for White Adipocyte Differentiation in vitro and Cell Number Control in vivo. **Plos one**, v. 7, n. 11, 2012.

JIMENEZ-PREITNER, M.; BERNEY, X.; ULDRY, M.. Article Plac8 Is an Inducer of C / EBP b Required for Brown Fat Differentiation , Thermoregulation , and Control of Body Weight. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 5, p. 658–670, 2011.

KAJIMURA, S.; SEALE, P.; SPIEGELMAN, B. M. Transcriptional Control of Brown Fat Development. **Cell metabolism**, v. 20, n. 2, p. 79–91, 2011.

KLEIN, C.; BAUERSACHS, S.; ULBRICH, S.E.; EINSPANIER, R.; MEYER, H.H.D.; SCHMIDT, S.E.M.; REICHENBACH, H.D.; VERMEHREN, M.; SINOWATZ, F.; BLUM, H.. Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the pre-attachment period. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 253–264, 2006.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C.. Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 165–183, 2003.

KUBELKA M.; MOTILK. J.; SCHULTZ. R.M.; PAVLOK. A.. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 292–302, 2000.

LEDFORD, J. G.; KOVAROVA, M.; KOLLER, B. H. Impaired Host Defense in Mice Lacking ONZIN. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 8, p. 5132–5143, 2007.

LI, C.; MA, H.; WANG, Y.; CAO, Z.. Excess PLAC8 promotes an unconventional ERK2-dependent EMT in colon cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 5, 2014.

LIANG, C.; SU, Y.; FAN, H.. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 21, n. 9, p. 2037–55, 2007.

LIBAULT, M.; STACEY, G.. Evolution of FW2.2-like (FWL) and PLAC8 genes in eukaryotes. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 10, p. 1226–1228, 2010.

LIMBURG, P. J.; HARMSSEN, W. S.; CHEN, H. H.. DNA Mismatch Repair Gene Alterations in a Population-Based Sample of Young-Onset Colorectal Cancer Patients. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 9, n. 6, p. 497–502, 2012.

LIU, Y.; SUI, H.; WANG, H.; YUAN, J.. Germinal Vesicle Chromatin Configurations of Bovine Oocytes. **Microscopy research and technique**, v. 69, p. 799–807, 2006.

LIU, W. M., CAO, Y.J.; YANG, Y.J.; LI, J.; HU, Z.; DUAN, E-K.. Tetraspanin CD9 regulates invasion during mouse embryo implantation. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 36, p. 121–130, 2006.

LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; TESSARO, I.. Role of gap junction-mediated communications in regulating large-scale chromatin configuration remodeling and embryonic developmental competence acquisition in fully grown bovine oocyte. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 30, n. 9, p. 1219–26, 2013.

LODDE, V.; MODINA, S.; GALBUSERA, C.. Large-Scale Chromatin Remodeling in Germinal Vesicle Bovine Oocytes: Interplay With Gap Junction Functionality and Developmental Competence. **Molecular reproduction and development**, v. 749, p. 740–749, 2007.

LODDE, V.; MODINA, S.; MADDOX-HYTTEL, P.. Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. **Molecular reproduction and development**, v. 75, n. 5, p. 915–24, 2008.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A.C.. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 137–152, 2006.

LUCCI, C.M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, J.R.; BÁO, S.N.. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, v. 15, p. 1467–1483, 2002.

LUCIANO, A. M.; FRANCIOSI, F.; DIECI, C.; LODDE, V.. Changes in large-scale chromatin structure and function during oogenesis: A journey in company with follicular cells. **Animal reproduction science**, v. 149, n. 1–2, p. 3–10, 2014.

LUCIANO, A. M.; FRANCIOSI, F.; MODINA, S. C.. Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism(s). **Biology of reproduction**, v. 85, n. 6, p. 1252–9, 2011.

LUCIANO, A. M.; LODDE, V.; BERETTA, M. S.. Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-culture system with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glutathione. **Molecular reproduction and development**, v. 71, n. 3, p. 389–97, 2005.

MACAULAY, D.; GILBERT, I.; CABALLERO, J.. The Gametic Synapse; RNA Transfer to the Bovine Oocyte. **Biology of reproduction**, 2014.

MACHADO, G. M.; CAIXETA, E. S.; LUCCI, C. M RUMPF. R.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N.. Post-hatching development of bovine embryos in vitro: the effects of tunnel preparation and gender. **Zygote**, p. 1-12, 2011.

MADDOX-HYTTEL, P.; ALEXOPOULOS, N.I.; VAJTA, G.; LEWIS, I.; ROGERS, P.; CANN, L.; CALLESEN, H.; TVEDEN-NYBORG, P.; TROUNSON, A.. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. **Reproduction**, v. 125, p. 607–23, 2003.

MAECKER H. T.; TODD, S. C.; LEVY, S.. The tetraspanin facilitators. **The faseb journal**, V.11, P.428 – 442, 1997.

MAGIN, T. M.; VIJAYARAJ, P.; LEUBE, R. E.. Structural and regulatory functions of keratins. **Experimental cell research**, v. 313, n. 10, p. 2021-32, 2007.

MCLAUGHLIN, E.; MCIVER, S. C.. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. **Reproduction**, v. 137, n. 1, p. 1–11, 2009.

MEHLMANN, L. M., SAEKI, Y., TANAKA, S., BRENNAN, T. J., EVSIKOV, A, V.. The Gs-Linked Receptor GPR3 Maintains Meiotic Arrest in Mammalian Oocytes. **SCIENCE**, V. 306, 1947-50, 2004.

MENEZO, Y.; RUSSO, G.; TOSTI, E.. Expression profile of genes coding for DNA repair in human oocytes using pangenomic microarrays, with a special focus on ROS linked decays. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 24, n. 11, p. 513–20, 2007.

MIHM, M.; AUSTIN, E.J.. The final stages of dominant follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 155–166, 2002.

MOURTADA-MAARABOUNI, M.; WATSON, D.; MUNIR, M.. Apoptosis Suppression by Candidate Oncogene PLAC8 is Reversed in Other Cell Types. **Current Cancer Drug Targets**, v.13, p. 80–91, 2013.

NAOUR, F. L.; RUBINSTEIN, E.; JASMIN, C.. Severely Reduced Female Fertility in CD9-Deficient Mice. **Science**, v. 287, p. 319–321, 2000.

NOGUEIRA, D.; RON-EL, R.; FRIEDLER, S.. Meiotic arrest in vitro by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. **Biology of reproduction**, v. 74, n. 1, p. 177–84, 2006.

ODAKA, C.; LORANGER, A.; TAKIZAWA, K.. Keratin 8 Is Required for the Maintenance of Architectural Structure in Thymus Epithelium. **Plos one**, v. 8, n. 9, 2013.

ORON, G.; FISCH, B.; ZHANG, X. Y.; GABBAY-BENZIV, R.; KESSLER-ICEKSON, G.; KRISSE, H; BEN-HAROUSH, A.; AO, A.; ABIR R.. Fibroblast growth factor 10 in human ovaries. **Reproductive biomedicine online**, v. 25, n. 4, p. 396–401, 2012.

OROZCO-LUCERO, E.; DUFORT, I.; ROBERT, C.; SIRARD, M.. Rapidly Cleaving Bovine Two-Cell Embryos Have Better Developmental Potential and a Distinctive mRNA Pattern. **Molecular Reproduction & Development**, v.81, p.31–41, 2014.

PALOMBO, F.; GALLINARI, P.; IACCARINO, I.; LETTIERI, T.; HUGHES, M.; D'ARRIGO, A.. GTBP a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. **Science**, v. 268, p. 1912–1914, 1995.

PARK, J.; SU, Y.; ARIGA, M.. EGF-Like Growth Factors As Mediators of LH Action in the Ovulatory Follicle. **Science**, V. 303 p. 682–684, 2004.

PFISTER-GENSKOW, M.; MYERS, C.; CHILDS, L.A.; LACSON, J.C.; PATTERSON, T.; BETTHAUSER, J.M.; GOUELEKE, P.J.; KOPPANG, R.W.; LANGE, G.; FISHER, P.; WATT, S.R.; FORSBERG, E.J.; ZHENG, Y.; LENO, G.H.; SCHULTZ, R.M.; LIU, B.; CHETIA, C.; YANG, X.; HOESCHELE, I.; EILERTSEN, K.J.. Identification of differentially expressed genes in individually bovine preimplantation embryos produced by nuclear transfer: improper reprogramming of genes required for development. **Biology of Reproduction**, v.71, p. 546–55, 2005.

POMINI PINTO, R.F.; FONTES, P.K.; LOUREIRO, B.; CASTILHO, A.C.S.; TICIANELLI, J. S.. Effects of FGF10 on Bovine Oocyte Meiosis Progression, Apoptosis, Embryo Development and Relative Abundance of Developmentally Important Genes In Vitro. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, p. 1–7, 2014.

PONTES, J. H. F., NONATO-JUNIOR I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M.. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 690–7, 2009.

PONTES, J. H.; MELO STERZAB, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R; SANCHES, B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M.. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, n. 9, p. 1640–6, 2011.

PORTELA, V. M.; DIRANDEH, E.; GUERRERO-NETRO, H. M.; ZAMBERLAM, G.; BARRETA, M. H.; GOETTEN, A. F., PRICE, C. A.. The role of fibroblast growth factor-18 in follicular atresia in cattle 1 Running title: FGF18 and granulosa apoptosis. **Biology of reproduction**, v. 92, n.1 14, p. 1-8, 2015.

RICHARDS, J. S.. Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 234, n. 1-2, p. 75–9, 2005.

RICHARDS, J. S.; RUSSELL, D. L.; ROBKER, R. L.. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, n. 1-2, p. 47–54, 1998.

RIZOS, D., LONERGAN, P., BOLAND, M.P., ARROYO-GARCIA, R., PINTADO, B., DE LA FUENTE, J., GUTIERREZ-ADAN, A.. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 589–95, 2002.

ROSE, R. D.; GILCHRIST, R. B.; KELLY, J. M.; THOMPSON, J. G., SUTTON-MCDOWALL, M. L., Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators . **Theriogenology**, v.79, p. 142–148, 2013.

RUI, Z.; JIAN-GUO, J.; YUAN-PENG, T. Use of serological proteomic methods to find biomarkers associated with breast cancer. **Proteomics**, v. 3, n. 4, p. 433–9, 2003.

SCHWARZ, K. R. L.; PIRES, P. R. L.; MESQUITA, L. G.. Effect of nitric oxide on the cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway during meiosis resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 81, n. 4, p. 556–64, 2014.

SHU, Y.; ZENG, H.; REN, Z.; ZHUANG, G.. Effects of cilostamide and forskolin on the meiotic resumption and embryonic development of immature human oocytes. **Human reproduction**, v. 23, n. 3, p. 504–513, 2008.

SIRARD, M.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M.. In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**, v. 68, p. 72–76, 2007.

SKINNER, M. K.. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Human reproduction update**, v. 11, n. 5, p. 461–471, 2005.

SPICER, L. J.; AAD, P. Y.; ALLEN, D. T.. Growth differentiation factor 9 (GDF9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by bovine theca cells: influence of follicle size on responses to GDF9. **Biology of reproduction**, v. 78, n. 2, p. 243–53, 2008.

SUGIMURA, S.; RITTER, L. J.; SUTTON-MCDOWALL, M. L.; MOTTERSHEAD, D. G., THOMPSON, J. G.; GILCHRIST R. B.. Amphiregulin co-operates with bone morphogenetic protein 15 to increase bovine oocyte developmental competence: effects on gap junction-mediated metabolite supply. **Molecular human reproduction**, v. 20, n. 6, p. 499–513, 2014.

SULLIVAN, R.; CABALLERO, J. N.; FRENETTE, G.. CD9-Positive Microvesicles Mediate the Transfer of Molecules to Bovine Spermatozoa during Epididymal Maturation. **Plos one**, v. 8, n. 6, 2013.

SUN, J.; LI, X.. Growth and antrum formation of bovine primary follicles in long-term culture in vitro. **Reproductive Biology**, v. 13, n. 3, p. 221–228, 2013.

SZAFRANSKA, B.; PANASIEWICZ, G. , MAJEWSKA, M.. Biodiversity of multiple Pregnancy-Associated Glycoprotein (PAG) family: gene cloning and chorionic protein purification in domestic and wild eutherians (Placentalia) – a review. **Reproduction Nutrition Development**, v. 5, p. 481–502, 2006.

TANAKA, Y.; NAKADA, K.; MORIYOSHI, M.; SAWAMUKAI Y.. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. **Reproduction**, v.121, p. 777–782, 2001.

TAN, J.; WANG, H.; SUN, X.; LIU, Y.. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. **Molecular human reproduction** v. 15, n. 1, p. 1–9, 2009.

TAO, G.; LOOI, K.; TOIVOLA, D. M.; STRNAD, P.; ZHOU Q.. Keratins, modulate the shape and function of hepatocyte mitochondria : a mechanism for protection from apoptosis. **Journal of cell science**, v.122, n.21, p. 3851 – 55, 2009.

THOMAS, R. E.; THOMPSON, J. G.; ARMSTRONG, D. T.. Effect of Specific Phosphodiesterase Isoenzyme Inhibitors During In Vitro Maturation of Bovine Oocytes on Meiotic and Developmental Capacity. **Biology of reproduction**, v. 71, p. 1142–1149, 2004.

TOIVOLA, D.M.; STRNAD, P.; HABTEZION, A.; OMARY, M.B.. Intermediate filaments take the heat as stress proteins. **Trend Cell Biology**, v. 20, n. 2, p. 79-91.

TOUZARD, E.; REINAUD, P.; DUBOIS, O.. Specific expression patterns and cell distribution of ancient and modern PAG in bovine placenta during pregnancy. **Reproduction**, v. 146, p. 347-362, 2013.

TRIPATHI, A.; KUMAR, K. V. P.; CHAUBE, S. K. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. **Journal of cellular physiology**, v. 223, n. 3, p. 592–600, 2010.

TSAFRIRI, A.; CHUN, S.; ZHANG, R.. Oocyte Maturation Involves Compartmentalization and Opposing Changes of cAMP Levels in Follicular Somatic and Germ Cells : Studies Using Selective Phosphodiesterase Inhibitors. **Developmental Biology**, v. 402, p. 393–402, 1996.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J.. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717–51, 2005.

VANHOUTTE, L.; SUTTER, P.; NOGUEIRA, D.; GERRIS, J. A. N.. Nuclear and cytoplasmic maturation of in vitro matured human oocytes after temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor. **Human Reproduction**, Vol. 22, N. 5, p. 1239–1246, 2007.

VANHOUTTE, L.; NOGUEIRA, D.; GERRIS, J. A. N.. Effect of Temporary Nuclear Arrest by Phosphodiesterase 3-Inhibitor on Morphological and Functional Aspects of In Vitro Matured Mouse Oocytes. **Molecular reproduction and development**, v. 175, p. 1021–1030, 2008.

VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHAO, M.P.; CAMARGO, L.S.A.. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Animal Reproduction**, v.9, p.12-18, 2012.

WRENZYCKI, C; STINSHOFF, H.. Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 48 Suppl 1, p. 38–43, 2013.

WU, R.; KAUSAR, H.; JOHNSON, P.. Hsp27 regulates Akt activation and polymorphonuclear leukocyte apoptosis by scaffolding MK2 to Akt signal complex. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 30, p. 21598–608, 2007.

XIANG, W.; MACLAREN, L. A.. Expression of Fertilin and CD9 in Bovine Trophoblast and Endometrium During Implantation. **Biology of reproduction**, v. 66, p. 1790–1796, 2002.

XIE, S.; GREEN, J.; BIXBY J. B.; SZAFRANSKA, B.; DEMARTINI, J. C.. The diversity and evolutionary relationships of the pregnancy-associated glycoproteins, an aspartic proteinase subfamily consisting of many trophoblast-expressed genes. **Biochemistry**, v. 94, p. 12809–12816, 1997.

ZENG, H.; RICHANI, D.; SUTTON-MCDOWALL, M. L.. Prematuration with Cyclic Adenosine Monophosphate Modulators Alters Cumulus Cell and Oocyte Metabolism and Enhances Developmental Competence of In Vitro- Matured Mouse Oocytes. **Biology of reproduction** v. 91, p. 1–11, 2014.

ZHANG, K.; HANSEN, P. J.; EALY, A. D.. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. **Reproduction**, v. 140, n. 6, p. 815–26, 2010.

ZHANG, M.; OUYANG, H.; XIA, G.. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. **Molecular human reproduction**, v. 15, n. 7, p. 399–409, 2009.

ZHANG, K; EALY, D.. Disruption of fibroblast growth factor receptor signaling in bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation reduces subsequent embryonic development. **Domestic animal endocrinology**, v. 42, n. 4, p. 230–8, 2012.

ZHONG, W; WANG, Q. T.; SUN, T.; WANG, F.; LIU, J.; LEACH, R.; JOHNSON, A.; PUSCHECK, E.E.; RAPPOLEE, D.A.. FGF ligand family mRNA expression profile for mouse preimplantation embryos, early gestation human placenta, and mouse trophoblast stem cells. **Molecular reproduction and development**, v. 73, n. 5, p. 540–50, 2006.

ZHOU, G.; LIU, G.; MENG, Q.. Tetraspanin CD9 in Bovine Oocytes and Its Role in Fertilization. **Journal of Reproduction and Development**, v. 55, n. 3, p. 305–308, 2009.

ZHOU, G.; ZENG, Y. A. N.; MENG, Q.. Decreased Expression of CD9 in Bovine Oocytes After Cryopreservation and the Relationship to Fertilization Capacity. **Molecular reproduction and development**, v. 80, p. 451–459, 2013

ZUCCOTTI, M.; MERICO, V.; CECCONI, S.; What does it take to make a developmentally competent mammalian egg? **Human reproduction update**, v. 17, n. 4, p. 525–40, 2011.

CAPÍTULO 2

RESUMO

EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO-10 NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Mateus Nunes Diógenes¹, Margot Alves Nunes Dode²

¹Médico Veterinário, Brasília-DF, Brasil, ²Pesquisadora PhD, Brasília-DF, Brasil

O presente estudo visou avaliar o efeito do FGF10 durante a pré-maturação e/ou maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos na produção *in vitro* de embriões bovinos. No primeiro experimento, os ovócitos foram maturados na presença ou não de FGF10. No segundo experimento, foi avaliado o efeito da suplementação de FGF10 durante a pré-maturação e/ou maturação, utilizando cinco grupos: T1: ovócitos maturados por 22h (controle); T2: ovócitos pré-maturados por 22h e maturados por 22h; T3: ovócitos pré-maturados por 22h e maturados por 22h com FGF10; T4: ovócitos pré-maturados por 22h com FGF10 e maturados por 22h; T5: pré-maturados por 22h com FGF10 e maturados por 22h com FGF10. Em ambos os experimentos foram avaliadas a maturação nuclear, a expansão das células do *cumulus*, a produção embrionária e a expressão dos genes: KRT8, PLAC8, CD9, PAG2, HSPB1 e MSH6 em embriões no D7 (experimento 1) ou D8 (experimento 2). Os dados de maturação nuclear e desenvolvimento embrionário foram analisados pelo teste do Qui-quadrado, e os da expansão das células do *cumulus* e expressão gênica por análise de variância, sendo $P < 0,05$ considerado estatisticamente significativo. No primeiro experimento, a suplementação com FGF10 durante a MIV não afetou ($P > 0,05$) nenhum dos parâmetros avaliados. No segundo experimento, após a maturação, a expansão em todos os tratamentos submetidos à pré-maturação, independente da presença de FGF10 ($P < 0,05$), foi menor do que no grupo controle. A presença de FGF10 na pré-maturação/maturação não aumentou a quantidade de embriões sendo a taxa de blastocisto em D7 similar ($P > 0,05$) entre T2 (43,7%), T3 (38,7%), T4 (39,6%) e T5 (47,3%). Entretanto, nos grupos T2 e T5 a taxa de blastocisto no D7 foi similar ao controle (53,4%). Todos os grupos apresentaram taxas de embriões eclodidos do D8 semelhantes. O nível de transcritos para o PLAC8 foi superior no grupo T4 quando comparado ao T1, os demais grupos foram iguais entre si. Já para o gene MSH6, somente foi detectada diferença no nível de transcritos entre os grupos T5 e T1, sendo inferior no T5. Conclui-se que a presença de FGF10 durante a MIV e/ou pré-MIV não afeta a produção e a qualidade dos embriões. A pré-maturação, independente do FGF10, afeta a expansão das células do *cumulus*, não tem efeito benéfico na produção, mas pode melhorar a qualidade embrionária.

Palavras chave: Pré-maturação, cilostamida, retenção meiótica, expansão, qualidade embrionária.

ABSTRACT

EFFECT OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR 10 ON *IN VITRO* PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS

Mateus Nunes Diógenes¹, Margot Alves Nunes Dode²

¹Veterinary, Brasília-DF, Brazil, ²Researcher, PhD, Brasília-DF, Brazil

This study aimed to evaluate the effect of FGF10 during pre-maturation and *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes on *in vitro* embryo production (IVP). In the first experiment oocytes were matured in the presence or not of FGF10. In the second experiment, the effect of FGF10 during pre-maturation and/or maturation was evaluated using 5 experimental groups: T1: oocytes matured for 22h (control); T2: oocytes pre-matured for 22h and matured for 22h; T3: oocytes pre-matured for 22h with FGF10 and matured for 22h; T4: oocytes pre-matured for 22h and matured for 22h with FGF10; T5: oocytes pre-matured for 22h with FGF10 and matured for 22h with FGF10. In both experiments, nuclear maturation, *cumulus* cells expansion, embryo production and the relative expression of genes: KRT8, PLAC8, CD9, PAGE2, HSPB1 and MSH6 were evaluated. Data of nuclear maturation and embryo development were analyzed by chi-square test and those of *cumulus* cells expansion and gene expression by analysis of variance. $P < 0.05$ was considered statistically significant. There was no effect of FGF10 supplementation during IVM on any of the parameters evaluated in the first experiment. On the second experiment after maturation a lower *cumulus* expansion was observed in all treatments submitted to pre-maturation irrespective of FGF10 presence than the control. The supplementation of pre-maturation or maturation medium with FGF10 did not cause an increase in embryo production on D7, being the blastocyst rate similar among T2 (43.7%), T3 (38.7%), T4 (39.6%) e T5 (47.3%). However, blastocyst rate was similar between T2, T5 and control (53, 4%). All the groups had similar hatching rates of embryos on D8. Transcripts level for PLAC8 was higher on T4 compared to T1, and similar for the other groups. For MSH6 gene, differences in transcripts level were only observed between T5 and T1. It can be concluded that presence of FGF10 during IVM and/or pre-maturation have not affected embryo production or quality. Pre-maturation, regardless presence of FGF10 affected *cumulus* expansion and embryo quality.

Keywords: pre-maturation, cilostamide, meiotic arrest, expansion, embryo quality

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma importante biotécnica da reprodução, pois potencializa o uso de fêmeas com alto valor genético, além de promover um aumento na velocidade do ganho genético do rebanho. Essa biotécnica já está sendo amplamente utilizada no Brasil, que é, hoje, o maior produtor de embriões produzidos *in vitro* do mundo (Viana et al., 2012).

A PIVE envolve uma série de eventos relacionados à maturação de ovócitos, fecundação e desenvolvimento embrionário na fase de pré-implantação. Dentre essas etapas, a maturação de ovócitos é um procedimento chave, visto que, as demais etapas do processo dependem do potencial de desenvolvimento dos ovócitos maduros. Embora os índices de maturação nuclear e de fecundação sejam elevados (80%), apenas 35-40% dos ovócitos bovinos maturados, fecundados e cultivados *in vitro* desenvolvem-se até o estágio de blastocisto (Pontes et al., 2009, 2011). Esses resultados sugerem que a maturação ainda é um fator limitante dentro do processo. Desta forma, na tentativa de melhorar a maturação ovocitária *in vitro* (MIV) e, conseqüentemente, as taxas de blastocisto, as pesquisas nessa área têm realizado modificações no processo de MIV.

Uma das alternativas utilizadas é a adição de substâncias ao meio de maturação que simulem o que acontece *in vivo* e melhorem as condições durante o cultivo. Dentre as substâncias estudadas estão os fatores de crescimento, recentemente relatados como importantes no estímulo da MIV (Zhang et al., 2010; Caixeta et al., 2013; Sugimura et al., 2014). Muitos desses fatores de crescimento são produzidos pelo ovócito e por células foliculares, e interagem entre si de forma parácrina para regular a foliculogênese e a ovogênese (Gasperin et al., 2012; Castilho et al., 2014).

Os Fatores de Crescimento de Fibroblastos (FGFs) controlam vários aspectos da fisiologia de embriões, fetos e adultos de várias espécies (Chen et al., 2000; Zhong et al.,

2006; Fields et al., 2011; Agha et al., 2014 ;) São importantes fatores de crescimento que atuam desde a formação inicial das células reprodutivas (Castilho et al., 2014) até a atresia (Portela et al., 2014) ou ovulação e formação do corpo lúteo (Castilho et al., 2008). Dentre os membros da família dos FGFs, o FGF10 tem sido bastante estudado. Ele é secretado tanto pelas células da teca, que estão ausentes durante a MIV, como pelo ovócito. O seu principal receptor, FGFR2B, é expresso nas células do *cumulus* e é regulado pelo hormônio folículo estimulante (FSH), revelando um papel importante na maturação ovocitária (Zhang & Ealy, 2012). Ele também já foi encontrado em útero de ovinos (Chen et al., 2000) e em ovários de bovinos e humanos (Buratini et al., 2007; Oron et al., 2012). Em caprinos, o FGF10 promoveu o crescimento e a sobrevivência de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* (Chaves et al., 2010). Benefícios na expansão das células do *cumulus*, na quantidade e no desenvolvimento de embriões bovinos, foram também relatados quando o FGF10 foi adicionado durante a MIV (Zhang et al., 2010). Entretanto, pouco se sabe sobre o mecanismo pelo qual esse fator afeta a qualidade do ovócito e o desenvolvimento embrionário inicial.

Além de melhorar os meios de maturação, outro aspecto que deve ser levado em conta quando se visa aumentar a eficiência da técnica de PIVE, é que muitos dos ovócitos obtidos para MIV são menos competentes e por isso são incapazes de formar embriões viáveis. *In vivo*, os ovócitos adquirem a competência nas fases finais do desenvolvimento folicular e, durante o período, os ovócitos sofrem mudanças estruturais e moleculares fundamentais para a aquisição de competência (Luciano et al., 2014). Entretanto, se retirados do ambiente folicular os ovócitos retomam automaticamente a meiose, independente de terem sofrido ou não essas modificações.

Nas técnicas de reprodução assistida (TRAs), os ovócitos são retirados dos folículos ovarianos prematuramente, sendo assim privados dos eventos que ocorrem na fase final da foliculogênese. Portanto, tem sido proposto por diversos autores um período de pré-maturação (pré-MIV), no qual a retomada da meiose, que ocorre logo após a aspiração, é bloqueada. Esse tempo adicional, dado aos ovócitos antes de serem submetidos a MIV, permitiria a realização das modificações necessárias para aumentar a competência (Albuz et al., 2010). Vários estudos têm sido realizados utilizando esse período de pré-maturação, mas pouco incremento na eficiência da produção de embriões tem sido obtido (Bilodeau-Goeseels, 2012; Guemra et al., 2014; Guimarães et al., 2015).

A suplementação do meio de pré-MIV com substâncias que possam aumentar a competência dos ovócitos poderia proporcionar melhorias nos sistemas de PIVE com aumento da produção de embriões. Considerando que os FGFs são componentes importantes

para a maturação ovocitária, e que as células da teca que produzem o FGF10 não estão presentes na MIV, a adição deste, durante o período de retenção, poderia também ser benéfico para o ovócito. Porém, o uso de suplementação com fatores de crescimento durante o período de retenção meiótica é escasso na literatura. O presente estudo visou testar se a presença de FGF10 durante a pré-MIV e MIV melhora o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

2 Material e métodos

2.1 Reagentes e produtos químicos

A menos que indicado, os reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos da Sigma (Sto. Louis, MO, USA).

2.2 Recuperação e seleção dos ovócitos

Ovários foram coletados de fêmeas mestiças (*Bos indicus* X *Bos taurus*) em abatedouros locais imediatamente após o abate e transportados em solução salina 0,9% (NaCl), suplementada com antibióticos (estreptomicina - 100µg/ml e penicilina G - 100 UI/ml) à temperatura de 35-36°C. O tempo de transporte entre o abate até o momento da aspiração dos folículos foi observado para não exceder o tempo máximo de 4 horas.

Os CCOs foram aspirados de folículos de 3-8 mm de diâmetro com auxílio de seringa de 10 ml e agulha de calibre 18 G. O material aspirado foi depositado em tubos plásticos de 15 ml (TPP®, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça) e, após a sedimentação do mesmo, foi retirado 10 ml do líquido folicular sobrenadante, que foi centrifugado por 5 minutos a 37°C e 700g, e utilizado para procura e seleção dos CCOs. O sedimento contendo os ovócitos foi transferido para placas estéreis de poliestireno de 96 mm de diâmetro (TPP®) contendo líquido folicular e avaliado em lupa estereoscópica (Stemi SV6, Zeiss®, Göttingen, Alemanha). Foram selecionados para os experimentos apenas os CCOs que possuíam pelo menos quatro camadas de células do *cumulus* compactas e citoplasma homogêneo.

2.3 Pré-maturação e maturação *in vitro*

Imediatamente após a seleção, os CCOs foram lavados e transferidos para o meio de pré-maturação ou maturação.

A pré-maturação consistiu de um período de 22 horas de cultivo antes dos CCOs serem submetidos à maturação *in vitro*. O meio utilizado para a pré-maturação era composto de TCM-199 com sais de Earl's (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 0,075 mg/ml de amicacina, 0,2% de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA-FAF), 1 µg/mL de L-glutamina, 1µM de Piruvato, 1µM de Cisteamina, 10 µM de Cilostamida e 10^{-4} UI/mL de FSH recombinante [rFSH (Gonal-F®, Merck Serono, Rockland, MA, USA)].

A maturação também era realizada por um período de 22 horas e o meio consistiu de TCM-199 com sais de Earl's suplementado com 0,075 mg/ml de amicacina, 0,4% de BSA-FAF, 1 µg/mL de L-glutamina, 1µM de Piruvato, 1µM de Cisteamina, e 10^{-1} UI/ml de rFSH. Tanto na pré-maturação como na maturação os ovócitos foram incubados em gotas de 200µl com até 30 estruturas, cobertas com óleo siliconado (360 Medical Fluid 350 CST-DOW CORNING®, New York, Canton, USA) e cultivados a 38,5°C em 5% de CO₂ em ar.

2.4 Solução estoque de Cilostamida e FGF10

A Cilostamida, que é um potente inibidor da PDE-3, foi preparada em solução estoque de 100X em dimetilsulfóxido (DMSO), alíquotada em tubos de microcentrífuga e conservada em *freezer* -20°C até o momento de uso, quando era diluída e adicionada no meio em uma concentração final de 10 µM. O FGF10 foi preparado em solução pronta para uso em PBS suplementado com 0,4% BSA livre de ácidos graxos, alíquotado em tubos de microcentrífuga e conservados em *freezer* - 80°C até o momento do uso, onde foi adicionado ao meio nas concentrações finais de 0,5 ng/ml.

2.5 Avaliação da cinética de maturação nuclear

Para avaliar o estágio da meiose nos diferentes momentos, os ovócitos foram retirados do cultivo, desnudados, fixados por 48 horas em etanol e ácido acético (3:1) e corados com lacmóide 45% em ácido acético glacial. Para todos os momentos os ovócitos foram desnudados por sucessivas pipetagens até a retirada completa das CCs.

A avaliação dos estágios da meiose foi realizada em microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse E200, 1,000X) e classificados em: vesícula germinativa (VG), vesícula germinativa rompida (GVBD); metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI) e metáfase II (MII), com alinhamento dos cromossomos na placa metafásica e extrusão do 1º corpúsculo polar. Foram considerados degenerados ou anormais, os ovócitos que apresentavam a cromatina com alguma aberração ou que não era possível identificar o estágio.

2.6 Avaliação da expansão das CCs

Os CCOs foram fotografados antes e após o cultivo na pré-maturação e na maturação com o auxílio de uma câmera Motic (Motic® Plus 2.0, Hong Kong, China). Posteriormente, a área (μm^2 – micrômetros quadrados) de cada CCOs de cada grupo foi mensurada com o programa Motic Image Plus 2.0. A expansão das CCs durante a pré-maturação foi determinada comparando a média das áreas dos CCOs de cada tratamento antes e após o período de pré-maturação. A expansão das CCs durante a MIV foi determinada pela subtração da média da área dos CCOs após a MIV (figura 2.2) pela média antes da MIV (figura 2.1).

2.7 Fecundação *in vitro*

Após a MIV os CCOs foram transferidos para gotas de 200 μL de meio de fecundação que consistia de meio *Tyrode's albumin lactate pyruvate* [TALP (Parrish et al., 1995)] suplementado com 0,5 mM de penicilamina, 0,25 mM de hipotaurina, 25mM de



Figura 2.1. Fotografia mostrando a medição da área dos complexos-*cumulus*-ovócitos antes da maturação *in vitro* com o programa Motic Image Plus 2.0.

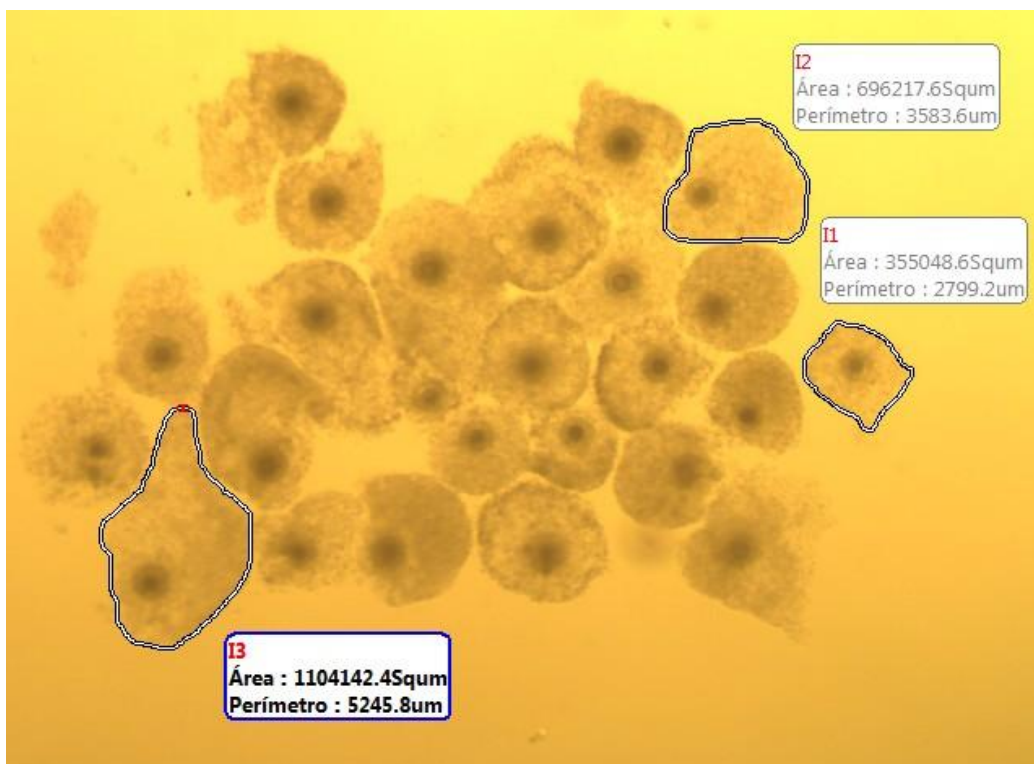


Figura 2.2. Fotografia mostrando a medição da área de expansão dos complexos-*cumulus*-ovócitos após a maturação *in vitro* com o programa Motic Image Plus 2.0.

epinefrina e 10µg/ml de heparina. Sêmen congelado da mesma partida de um touro da raça Nelore, previamente testado para a produção *in vitro* de embriões, foi utilizado para todos os tratamentos e réplicas. Após o descongelamento, os espermatozoides foram selecionados pelo método de gradiente de *Percoll* 90 e 45% (GE® Healthcare, Piscataway, NJ, USA), utilizando (400µl) em microtubos de 2 ml, centrifugado por 5 minutos a 5.400g. O pellet obtido foi ressuspendido e adicionado na gota de fecundação de forma a se obter uma concentração final de 1×10^6 espermatozoides/ml móveis. Os ovócitos foram coincubados com os espermatozoides a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar por um período de 18 horas. O dia da inseminação foi considerado como dia 0 (D0).

2.8 Cultivo *in vitro*

Após o período de fecundação, os possíveis zigotos foram gentilmente pipetados para a remoção das CCs, lavados e transferidos para o meio de fluido sintético de oviduto (SOF) suplementado (Holm et al., 1998) com aminoácidos essenciais e não essenciais, 0,34 mM de sódio tri-citrato, 2,77 mM de myo-inositol e 5% de Soro Fetal Bovino [FCS (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA)] em gotas de 200µl, cobertas por óleo mineral, incubados em estufa a 38,5°C e com 5% de CO₂ em ar.

Os embriões foram observados em D2 para avaliação da clivagem e em D6, D7 e D8 pós-inseminação (p.i.) para a produção de blastocistos.

2.9 Quantificação da expressão gênica de embriões

Para a avaliação da expressão gênica nos embriões, no experimento 1, foram utilizados embriões D7 no estágio de blastocisto expandido (Bx), no experimento 2, foram utilizados embriões D8 no estágio de Blastocisto eclodido (Be). Os embriões foram lavados 3 vezes em solução salina em tampão fosfato (PBS) livre de cálcio e magnésio, estocados em eppendorf® com RNA *latter* e armazenados a -20°C até o momento da extração do RNA.

A abundância relativa de seis genes relacionados com: estresse - *Heat shock 27kDa protein 1* – (HSPB1); desenvolvimento da placenta – Proteína Keratina 8 (KRT8),

Placental-specific 8 (PLAC8), Glicoproteína associada a gestação 2 (PAG2); implantação – *Tetraspanin 9* (CD9); reparo de DNA – *DNA mismatch repair protein MSH, mutS homolog 6* – (MSH6), foi quantificada por qPCR.

O qPCR foi realizado em um 7500 *Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, USA). Os embriões para quantificação dos genes foram produzidos com a metodologia descrita acima, coletando amostras para formar 3 *pools* de 10-12 embriões para cada tratamento dos experimentos 1 e 2. O RNA total foi isolado usando o *Kit RNeasy Plus Micro* (Quiagen®, Hilden, Germany), de acordo com instruções do fabricante (com pequenas modificações). A síntese de cDNA foi realizada usando *SuperScriptIII* (200 U / μ L, Invitrogen) e primer Oligo-dT (0,5 μ g / μ L, Invitrogen) em um volume final de 24 μ L. As reações foram realizadas a 65 °C por 5 minutos e 42 °C por 60 minutos, seguido pela inativação da enzima a 70 °C por 15 minutos. A análise do qPCR foi realizada com o *Fast Sybr Green Master Mix* (Applied Biosystems).

As reações foram otimizadas para promover eficiência de amplificação máxima para cada gene (90 – 110%) por cálculos usando as curvas padrões relativas no programa 7500 2.0.3 (Applied Biosystems). Cada amostra foi analisada em duplicata e a especificidade de cada produto de PCR foi determinada pela análise da curva de *melting* e tamanho do *amplicon* em gel de agarose. As reações foram realizadas em um volume final de 25 μ L usando cDNA correspondente a 0,5 embrião. As condições dos ciclos do PCR foram 95 °C por 5 minutos, seguido de 50 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e então anelamento a 60 °C por 1 minuto. O nome, a sequência e concentração do primer, tamanho do amplicon e temperatura de anelamento de cada gene estão listadas na Tabela 1.

O nível de expressão de três genes constitutivos, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH), β -Actina (ACTB) e *Peptidylprolylisomerase A* (PPIA) foram submetidos ao programa GeNorm (Vandesompele et al., 2002), que indicou o ACTB como sendo o gene mais estável. Esse foi usado como referência para normalização dos dados. A expressão relativa de cada gene foi calculada usando o método de $\Delta\Delta$ Ct com correção da eficiência pelo método Pfaffl (Pfaffl, 2001).

Tabela 2.1. Informação dos primers específicos usados para amplificação dos fragmentos de genes para análise em PCR em tempo real.

Genes	Sequência do primer	Tamanho do Amplicon (bp)	Concentração do primer (nM)	Número de acesso ao Banco de Gene/ referência
B-actina	F: GGC ACC CAG CAC AAT GAA GAT CAA	126	300	XM_010845770.1
	R: ATC GTA CTC CTG CTT GCT GAT CCA			
KRT8	F: TGT GAA GAA GAT TGAG ACC CG CGA	160	300	X12877 (El-Sayed <i>et al.</i> 2006)
	R: AAACCTCAGGTCCTCTGTGCA GAT			
CD9	F: CAC ATC AGT CCA ACC CAG AC	146	300	NM_173900 (El-Sayed <i>et al.</i> 2006)
	R: AATCGGAGCCATAGTCCA AC			
PLAC8	F: GACTGGCAGACTGGCATCTT	140	300	NM_016619 (El-Sayed <i>et al.</i> 2006)
	R: CTCATGGCGACA CTTGATCC			
HSPB1	F: CTGGACGTCAACCAC TTC	180	250	NM_001025569.1
	R: GGACAGAGAGGAGGAGAC			
PAG2	F: GAACACAAA CAAGCCAGAG	208	200	NM_176614
	R: TTGGCCGTAGATCA TTG			
MSH6	F: CCCAGGTGCTTAAAGGTATG	186	300	NM_001192737.1
	R: GGACCA TGT CAG AATCCA AG			

F: *primer forward*; R: *primer reverse*

3 Delineamento experimental

Para avaliação do efeito da suplementação de FGF10 na pré-maturação e/ou maturação *in vitro* de ovócitos bovinos foram realizados dois experimentos:

3.1 Experimento 1: Efeito da suplementação de FGF10 durante a MIV na produção *in vitro* de embriões bovinos

Este experimento objetivou avaliar se a adição do FGF10 durante a MIV de ovócitos bovinos afetaria a produção e a qualidade de embriões. Os CCOs foram selecionados

e divididos em dois grupos, um controle e outro maturado com a suplementação de 0,5 ng/ml de FGF10.

Inicialmente foram utilizados 244 CCOs para a avaliação da cinética de maturação nuclear. Essa avaliação foi realizada para verificar se o FGF10 alteraria a velocidade de progressão da meiose. Os CCOs maturados *in vitro* na presença ou não de FGF10 foram avaliados as 0, 8 e 24 h de maturação. Em cada momento os ovócitos foram desnudados, fixados e corados para determinação do estágio da meiose.

Posteriormente, 250 CCOs maturados na ausência ou na presença FGF10 foram fecundados e cultivados *in vitro* até o D7 de desenvolvimento. Foi avaliada a expansão das CCs, a taxa de clivagem em D2 e a de blastocisto em D6 e D7. A velocidade de desenvolvimento dos embriões foi determinada de acordo com o estágio em que os mesmos encontravam-se em D6 e D7. A qualidade dos embriões foi avaliada pela velocidade de desenvolvimento e pela quantificação da expressão de genes.

3.2 Experimento 2: Efeito da suplementação de FGF10 durante a pré-maturação e/ou maturação na produção *in vitro* de embriões bovinos

Neste experimento foi proposta a utilização da retenção meiótica por um período de 22 horas antes de submeter os CCOs à maturação *in vitro*. O objetivo de reter a meiose antes da maturação foi fornecer ao ovócito um tempo adicional para que se torne mais competente. Portanto, foi testado se a presença do FGF10 durante a retenção teria efeito benéfico aos ovócitos aumentando a sua capacidade de desenvolvimento. Foram utilizados cinco tratamentos:

T1 (MIV): ovócitos maturados por 22h no meio de maturação (controle).

T2 (PM/MIV): ovócitos submetidos à pré-maturação por 22h e, posteriormente maturados por 22h.

T3 (PM+FGF10/MIV): ovócitos submetidos à pré-maturação por 22h em meio suplementado com FGF-10 e posteriormente maturados por 22h no meio de maturação.

T4 (PM/MIV+FGF10): ovócitos submetidos à pré-maturação por 22h em meio sem FGF10 e posteriormente maturados por 22h em meio de maturação suplementado com FGF10.

T5 (PM+FGF10/MIV+FGF10): ovócitos submetidos à pré-maturação por 22h em meio suplementado com FGF10 e posteriormente maturados por 22h em meio de maturação suplementado com FGF10.

Para confirmar que os ovócitos permaneciam bloqueados durante a retenção na presença de FGF10, uma amostra foi retirada no início (0 hora) e no final (22 horas) do período de pré-maturação. Amostras para avaliação da maturação nuclear foram coletadas às 0, 8 e 22 horas de maturação. Sendo utilizado um total 548 CCOs.

Posteriormente, foi avaliado o efeito da suplementação do FGF10 na pré-maturação e/ou maturação, na expansão das CCs e no desenvolvimento embrionário. Para essa avaliação foram realizados os mesmos tratamentos citados acima. Foram utilizados 577 CCOs maturados na ausência ou na presença FGF10 que foram fecundados e cultivados in vitro até o D8 de desenvolvimento. Foi avaliada a expansão das CCs antes e após a maturação, e após a fecundação foi avaliada a taxa de clivagem no D2, taxa de blastocistos no D6, D7 e D8, velocidade de desenvolvimento no D7 e D8 e expressão de genes relacionados à qualidade embrionária no D8.

4 Análise Estatística

Os dados de maturação nuclear e desenvolvimento embrionário foram analisados pelo teste do Qui-quadrado ($P < 0,05$). A comparação entre os tratamentos quanto à mensuração da expansão das células do *cumulus* e expressão gênica, foram realizadas por análise de variância (ANOVA). Todos os dados relativos à expansão tiveram distribuição normal. Foi utilizado o teste T para comparação da expansão das CCs entre os dois grupos do primeiro experimento e o teste de Tukey para comparação da expansão entre os 5 grupos do segundo experimento. A expressão relativa de cada gene foi calculada usando o método de $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência pelo método Pfaffl. No experimento 1 foi utilizado o Teste t (Welch-Satterthwaite approximation) e no experimento 2 o teste Dunnett (controle versus cada um dos grupos). Valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Todas as análises foram realizadas pelo programa Prophet, versão 5.0 (BBN systems and Technologies, 1996)

5 Resultados e discussão

5.1 Experimento 1: Efeito da suplementação de FGF10 durante a MIV na produção *in vitro* de embriões bovinos

Para determinar se o FGF10 alteraria a velocidade de progressão da meiose e ter certeza de que o período de maturação a que os ovócitos seriam submetidos estava adequada, foi feita a avaliação da cinética de maturação nuclear. A taxa de ovócitos em VGBD às 8 horas foi inferior no grupo onde o FGF10 foi adicionado, porém a taxa de MI, AI e TI foi semelhante (Tabela 2). Os resultados mostraram que a presença de FGF10 durante a maturação causou um atraso na retomada da meiose. Entretanto, esse efeito não foi observado para os demais momentos de avaliação, sendo que às 22 horas a porcentagem de ovócitos que completaram a maturação nuclear foi semelhante em ambos os grupos ($P < 0,05$).

Tabela 2.2 Estágio da meiose de ovócitos bovinos cultivados em meio de maturação suplementados ou não com 0,5 ng/ml de FGF10 nos momentos 0, 8 e 22 horas.

Tratamentos	N	Estágio da Meiose			
		VG (%)	VGBD (%)	MI, AI, TI (%)	MII (%)
Controle 0h	41	41 (100) ^a	0 (0) ^c	0 (0) ^c	0 (0) ^b
Controle 8h	87	3 (3,4) ^c	53 (60,9) ^a	31 (35,6) ^a	0 (0) ^b
FGF10 8h	33	9 (27,3) ^b	11 (33,3) ^b	13 (39,4) ^a	0 (0) ^b
Controle 22h	39	0 (0) ^d	0 (0) ^c	5(12,8) ^b	34 (87,2) ^a
FGF10 22h	44	0 (0) ^d	0 (0) ^c	4(9,1) ^b	40 (90,9) ^a

^{a, b, c, d} Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste qui-quadrado ($P < 0,05$). VG = vesícula germinativa; VGBD = vesícula germinativa rompida; MI = metáfase 1; AI = anáfase 1; TI = Telófase 1; MII = metáfase II.

A presença do FGF10 não afetou a expansão das células do *cumulus* após a MIV (Figura 2.3).

Os dados relativos ao efeito do FGF10 na produção de embriões *in vitro* são apresentados na tabela 3. A presença de FGF10 durante a maturação *in vitro* não afetou a taxa de clivagem nem a taxa de blastocisto em D6 e D7.

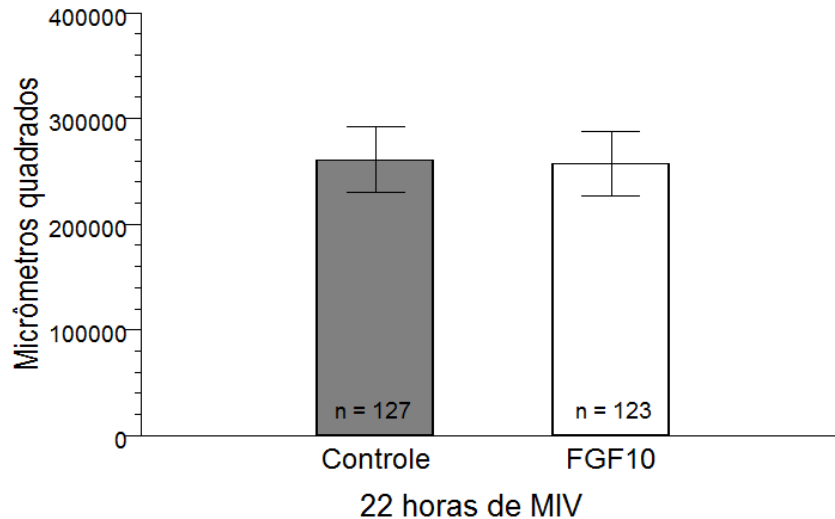


Figura 2.3. Área de expansão dos complexos-*cumulus*-ovócitos submetidos à maturação *in vitro* por 22h no grupo controle e no grupo em que o meio de maturação foi suplementado com 0,5 ng/mL de FGF10. Os dados foram obtidos da subtração do valor da área inicial média de cada CCOs (μm^2 – micrômetros quadrados) do valor da área final média de cada CCOs após a maturação *in vitro*. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão e foram analisados pelo teste T ($P > 0,05$).

Tabela 2.3. Efeito da exposição dos complexos-*cumulus*-ovócitos ao FGF10 durante a maturação *in vitro* (MIV+FGF10) na taxa de clivagem no dia 2 (D2) de desenvolvimento e na taxa de blastocisto no D6 e D7 de desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Grupo	N	Clivagem-D2	Blastocistos-D6	Blastocistos-D7
Controle	127	109 (85,8%)	56 (44,9%)	62 (48,8%)
MIV + FGF10	123	114 (92,6%)	45(36,6%)	59 (47,9%)

Dados analisados pelo teste chi-quadrado ($P < 0,05$).

Quando a velocidade de desenvolvimento dos embriões foi avaliada observou-se que o tratamento não afetou a cinética de desenvolvimento embrionário, sendo que a maioria dos embriões em D7 encontrava-se em estágio de blastocisto expandido em ambos os tratamentos (Tabela 2.4)

Dos seis genes analisados todos apresentaram abundância relativa de transcritos semelhante ($P > 0,05$) entre os embriões dos dois grupos (Figura 2.4). Entretanto, pode-se observar que o grupo em que os ovócitos foram maturados na presença de FGF10 houve menor variação entre réplicas biológicas do que os do grupo controle.

Tabela 2.4. Efeito da exposição dos complexos-cumulus-ovócitos ao FGF10 durante a MIV na taxa de blastocisto no D6 e D7 de cultivo embrionário.

Grupo	D6					D7				
	N	Bi (%)	Bl (%)	Bx (%)	Total (%)	Bi (%)	Bl (%)	Bx (%)	Be (%)	Total (%)
Controle	127	15 (26,7)	17 (30,3)	24 (42,8)	56 (44,09)	1 (1,6)	12 (19,3)	37 (59,6)	12 (19,3)	62 (48,8)
MIV+FGF10	123	11 (24,4)	15 (33,3)	19 (42,2)	45 (36,6)	0 (0)	11 (18,6)	38 (64,4)	10 (16,9)	59 (47,9)

Dados analisados pelo teste chi-quadrado ($P > 0,05$).

Bi = blastocisto inicial, Bl = blastocisto, Bx = blastocisto expandido, Be= Blastocisto eclodido.

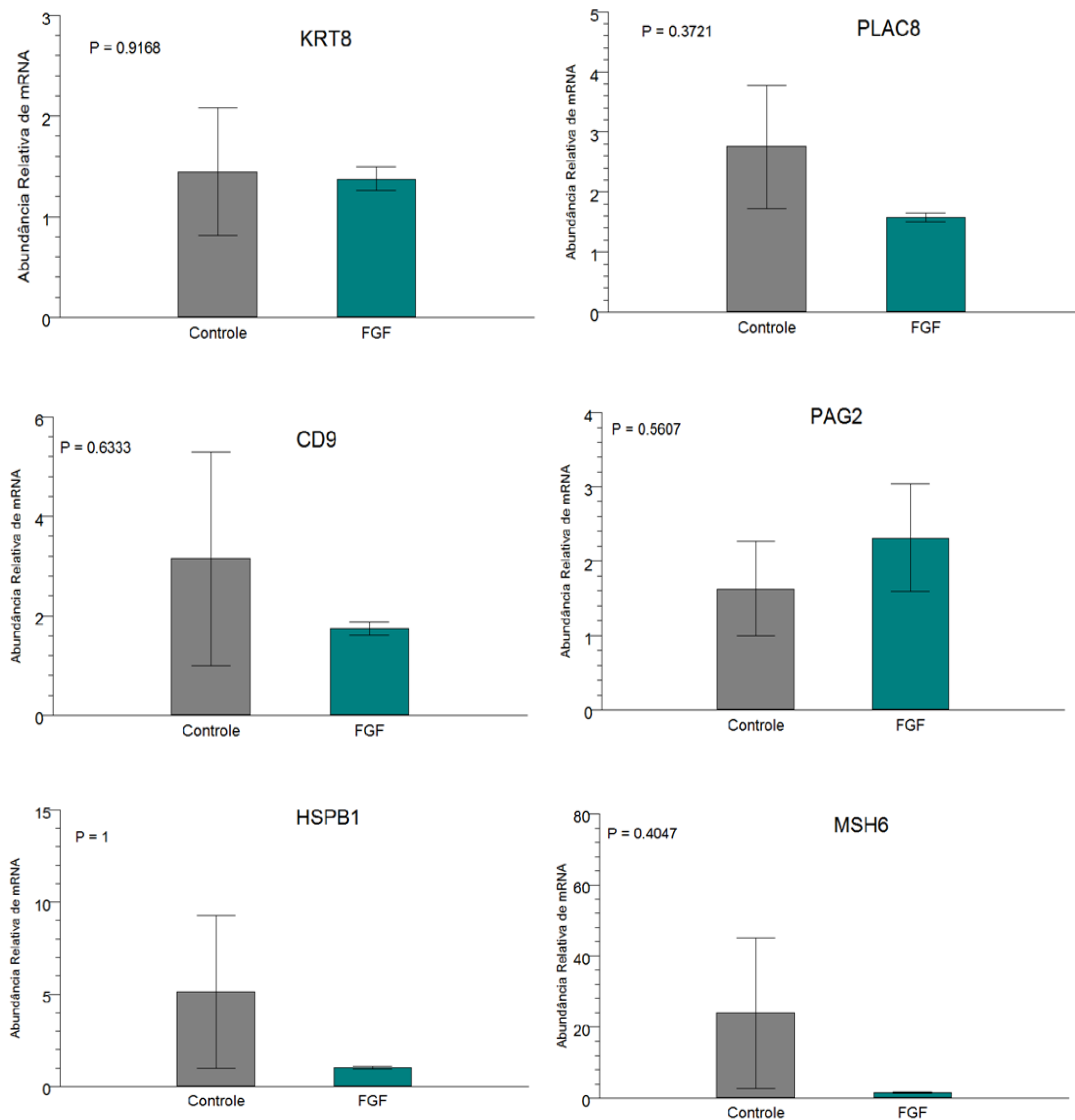


Figura 2.4. Nível de transcritos dos genes KRT8, PLAC8, CD9, PAG2, HSPB1 e MSH6 analisados por PCR em tempo real em embriões bovinos oriundos de complexos cumulus ovócitos maturados na presença (FGF) ou não (Controle) de FGF10. Cada grupo foi analisado utilizando-se três *pools* de blastocistos expandidos de diferentes réplicas. Os dados (média \pm dp) foram normalizados pelo gene ACTB e expressos em relação à amostra controle, através do método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência. Os dados foram analisados pelo teste Teste t (Welch-Satterthwaite approximation) ($P < 0,05$).

5.2 Experimento 2: Efeito da suplementação de FGF10 durante a pré-maturação e/ou maturação na produção *in vitro* de embriões bovinos

Nesse experimento foi proposta a utilização da retenção meiótica por um período de 22 horas antes de submeter os CCOs à MIV.

Para confirmar que os ovócitos permaneciam bloqueados durante a retenção, os ovócitos foram analisados no início da maturação (0 hora: Controle), o que correspondeu ao

final do período de retenção (0 hora: Pcont-Mcont, Pcont-MFGF10, PFGF10-Mcont, PFGF10-MFGF10) e, posteriormente as 8 e 22 horas de maturação (tabela 2.5). À 0 hora de maturação, todos os tratamentos onde foi feita a retenção foram semelhantes entre si com relação à porcentagem de VG, porém já apresentavam alguns ovócitos em estágio mais avançados de maturação nuclear (MI, AI, TI) quando comparado ao controle. Às 8 horas de maturação, todos os tratamentos onde ocorreu pré-maturação, independente da adição do FGF10, tiveram taxa de ovócitos VGBD e MI, AI, TI semelhantes. Porém, apenas no tratamento onde não foi adicionado FGF10 (Pcont-Mcont), houve taxa de ovócitos em MI, AI, TI semelhante ao controle. Às 22 horas de maturação, todos os tratamentos, independente da adição de FGF10, tiveram taxa de ovócitos em MII semelhante.

Posteriormente foi averiguado se a suplementação do meio com 0,5 ng/ml de FGF10 durante o período de retenção por 22 horas alteraria a expansão das CCs. Os resultados mostram que em nenhum dos tratamentos houve expansão das CC durante a pré-maturação (Figura 2.5).

Já após a MIV a expansão média das CC dos grupos em que os CCOs foram submetidos à retenção foi inferior a do grupo controle (Figura 2.6).

O potencial de desenvolvimento dos CCOs submetidos à retenção por 22 horas está apresentado na Tabela 6. As taxas de clivagem e blastocistos em D6 foram similares ($P > 0,05$) em todos os grupos. Em D7 os grupos submetidos à retenção apresentaram taxas de blastocisto similares, além disso, nos grupos onde o FGF10 foi adicionado apenas no meio de pré-MIV (PFGF10-MCont) e, no que o FGF10 foi adicionado apenas no meio de MIV (PCont-MFGF10), foram inferiores ($P < 0,05$) as do grupo o controle. Da mesma forma em D8, todos os grupos submetidos à retenção apresentaram taxas de blastocistos similares e na maioria deles inferiores as do grupo controle (Tabela 2.6).

Quando a velocidade de desenvolvimento embrionário foi avaliada (Tabela 2.7), em D7, a taxa de blastocistos expandidos foi superior no controle, que foi igual apenas no grupo onde o FGF foi adicionado durante pré-MIV e MIV (PFGF-MFGF). Já a taxa de embriões eclodidos foi semelhante ($P > 0,05$) entre todos os grupos submetidos à retenção e superior ao controle apenas nos grupos onde não houve adição de FGF10 durante a pré-maturação. O único tratamento que foi igual ao controle em estágios embrionários em D7 e D8 foi o grupo onde o FGF10 foi adicionado na pré-MIV e MIV (PFGF-MFGF).

Tabela 2.5. Estágio da meiose durante a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos cultivados em meio de pré-maturação por 22 horas suplementado (PFGF10) ou não (Pcont) com 0,5 ng/ml de FGF10 e, posteriormente maturados por 0, 8 e 22 horas em meio de maturação suplementado (MFGF10) ou não (Mcont) com 0,5 ng/ml de FGF10.

Hora MIV	Tratamentos	N	Estágio da Meiose			
			VG (%)	VGBD (%)	MI, AI, TI (MII (%)	
0 hora	Controle	48	45 (93,7) ^a	3 (6,2) ^{d,e,f}	0 (0) ^d	0 (0) ^b
	Pcont-Mcont	33	20 (60,6) ^{b,c,d}	10 (30,3) ^b	3 (9,1) ^c	0 (0) ^b
	Pcont-MFGF10	29	22 (75,9) ^{b,c}	4 (13,8) ^{b,c,d,e}	3 (10,3) ^c	0 (0) ^b
	PFGF10-Mcont	26	18 (69,2) ^{b,c,d}	4 (15,4) ^{b,c,d,e}	3(11,5) ^c	0 (0) ^b
	PFGF10-MFGF10	24	21 (87,5) ^{a,b}	2 (8,3) ^{c,d,e,f}	1(4,2) ^c	0 (0) ^b
8 horas	Controle	104	10 (9,6) ^{g,h}	62 (59,6) ^a	32 (30,8) ^b	0 (0) ^b
	Pcont-Mcont	36	17 (47,2) ^{d,e}	4 (11,1) ^{c,d,e}	15(41,7) ^{a,b}	0 (0) ^b
	Pcont-MFGF10	37	11 (29,7) ^{e,f}	4 (10,8) ^{c,d,e}	22 (59,4) ^a	0 (0) ^b
	PFGF10-Mcont	33	7 (21,2) ^{f,g}	8 (24,2) ^{b,c}	18 (54,5) ^a	0 (0) ^b
	PFGF10-MFGF10	36	10 (27,8) ^{e,f}	8 (22,2) ^{b,c}	18 (50) ^a	0 (0) ^b
22 horas	Controle	25	0 (0) ^h	0 (0) ^f	0 (0) ^{c,d}	25 (100) ^a
	Pcont-Mcont	26	0 (0) ^h	0 (0) ^f	1 (3,9) ^{c,d}	25 (96,1) ^a
	Pcont-MFGF10	27	0 (0) ^h	0 (0) ^f	1 (3,7) ^{c,d}	26 (96,3) ^a
	PFGF10-Mcont	29	0 (0) ^h	0 (0) ^f	2 (6,9) ^{c,d}	27 (93,1) ^a
	PFGF10-MFGF10	35	0 (0) ^h	1 (2,8) ^{e,f}	0 (0) ^d	34 (97,1) ^a

(^{a,b,c,d,e,f,g,h}) Todos os tratamentos nas diferentes horas foram comparados dentro do mesmo estágio (coluna). Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste chi-quadrado (P<0,05)

VG = vesícula germinativa; VGBD = vesícula germinativa rompida; MI = metáfase 1; AI = anáfase 1; TI = Telófase 1; MII = metáfase II.

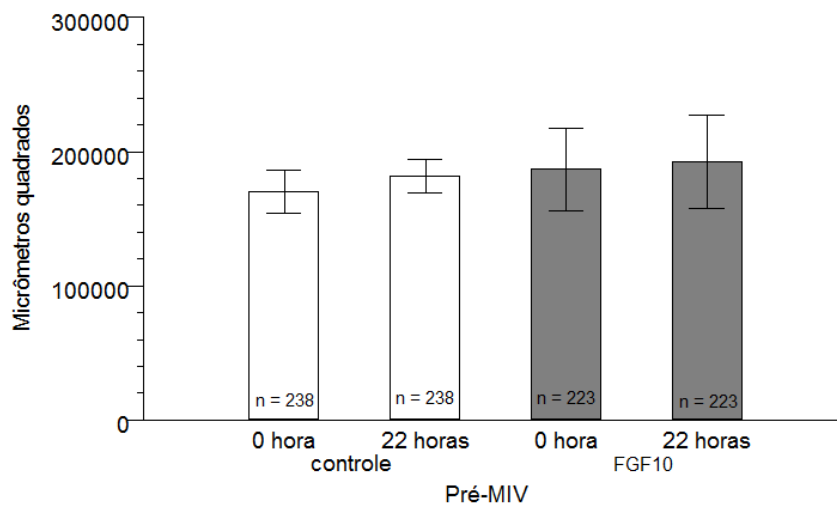


Figura 2.5. Área de expansão dos complexos-cumulus-ovócitos durante a pré-maturação por 22h. No grupo controle a pré-maturação foi realizada na ausência de FGF-10 e no grupo FGF-10 o meio de foi suplementado com 0,5 ng/mL de FGF10. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão e foram analisados com o teste de Tukey. Os dados foram obtidos do valor da área média inicial (0 hora) (μm^2 – micrômetros quadrados) dos CCOs e do valor da área média dos CCOs após a pré-MIV (22 horas).

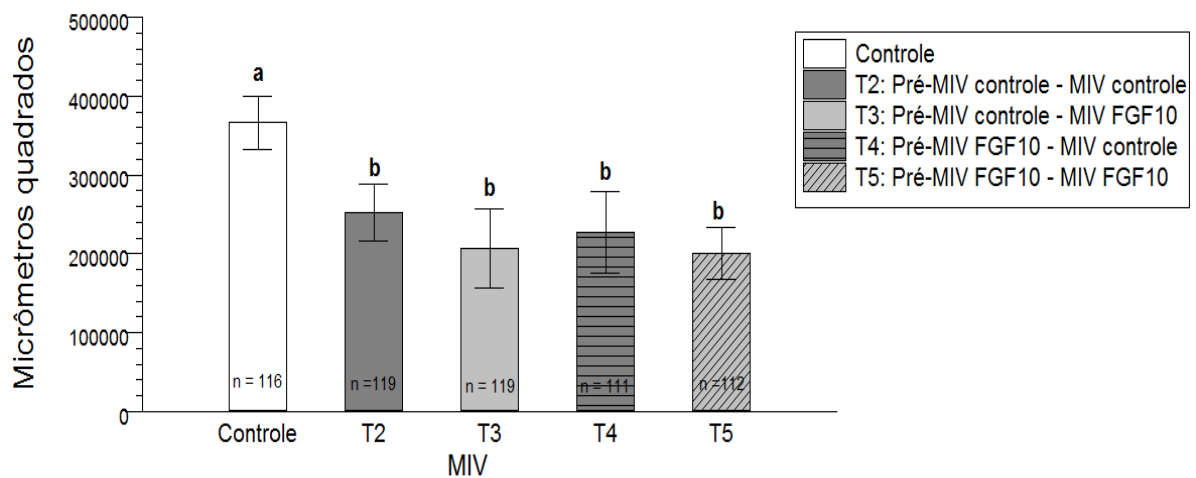


Figura 2.6. Área de expansão de complexo-cumulus-ovócitos submetidos à pré-maturação por 22 horas com (Pré-MIV FGF10) e sem FGF10 (Pré-MIV controle) e posteriormente maturados por 22 horas com (MIV FGF10) e sem FGF10 (MIV controle). Diferentes letras nas colunas representam diferenças significativas ($P < 0,05$). Os dados são expressos como média e \pm desvio padrão e foram analisados com o teste de Tukey. Os dados foram obtidos do valor da área média inicial (0 hora) (μm^2 -micrômetros quadrados) dos CCOs subtraído do valor da área média final dos CCOs após a MIV (22 horas).

Tabela 2.6. Desenvolvimento embrionário nos dias (D) 2, 6, 7, e 8 de cultivo de ovócitos bovinos submetidos a pré-maturação por 22 horas em meio suplementado (PFGF10) ou não (Pcont) com 0,5 ng/ml de FGF10, e posteriormente maturados por 22 horas em meio de maturação suplementado (MFGF10) ou não (Mcont) com 0,5 ng/ml de FGF10.

Tratamento	Nº	Clivagem -D2	Blastocistos D6	Blastocistos -D7	Blastocistos D8
Controle	116	96 (82,8%) ^a	39 (33,6%) ^a	62 (53,4%) ^a	64 (55,2%) ^a
PCont-Mcont	119	87 (73,1%) ^a	34 (28,6%) ^a	52 (43,7%) ^{a,b}	48 (40,3%) ^b
PCont-MFGF	119	93 (78,2%) ^a	37 (31,1%) ^a	46 (38,7%) ^b	52 (43,7%) ^{a,b}
PFGF-Mcont	111	88 (79,3%) ^a	27 (24,3%) ^a	44 (39,6%) ^b	46 (41,4%) ^b
PFGF-MFGF	112	93 (83%) ^a	38 (33,9%) ^a	53 (47,3%) ^{a,b}	50 (44,6%) ^{a,b}

^{a,b} Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste chi-quadrado ($P < 0,05$).

Dos seis genes analisados, KRT8, CD9, PAG2 e HSPB1 tiveram expressão semelhante entre os tratamentos (Figura 2.7). O nível de transcritos para o PLAC8 foi superior no grupo T4 (pré-MIV FGF10 – MIV controle) quando comparado ao grupo controle (T1), os demais grupos foram iguais entre si. Já para o gene MSH6, somente foi detectada diferença na abundância relativa de transcritos entre o grupo T5 (pré-MIV FGF10 – MIV FGF10) e T1 (controle).

Tabela 2.7. Estágio de desenvolvimento embrionário nos dias (D) 7 e 8 de cultivo de ovócitos bovinos submetidos a pré-maturação por 22 horas em meio de suplementado (PFGF10) ou não (Pcont) com 0,5 ng/ml de FGF10 e, posteriormente maturados por 22 horas em meio de maturação suplementado (MFGF10) ou não (Mcont) com 0,5 ng/ml de FGF10.

Tratamento	D7					D8			
	Bi	Bl	Bx	Be	total	Bl	Bx	Be	total
Controle	3 (4,8%) ^a	5 (8%) ^a	48(77,4%) ^a	6 (9,7%) ^b	62 (53,4%) ^a	2(3,1%) ^a	26 (40,6%) ^{a,b}	36 (56,2%) ^a	64 (55,2%) ^a
PCont-Mcont	1 (1,9%) ^a	10 (19,2%) ^a	26 (50%) ^b	15 (28,8%) ^a	52 (43,7%) ^{a,b}	0 (0%) ^a	17 (35,4%) ^{a,b}	31 (64,6%) ^a	48 (40,3%) ^b
PCont-MFGF	2 (4,3%) ^a	6 (13%) ^a	23 (50%) ^b	15 (32,6%) ^a	46 (38,7%) ^b	3 (5,8%) ^a	16 (30,8%) ^{a,b}	33 (63,5%) ^a	52 (43,7%) ^{a,b}
PFGF-Mcont	4 (9%) ^a	6 (13,6%) ^a	26 (59%) ^b	8 (18,2%) ^{a,b}	44 (39,6%) ^b	0 (0%) ^a	20 (43,5%) ^a	26 (56,5%) ^a	46 (41,4%) ^b
PFGF-MFGF	1 (1,9%) ^a	9 (17%) ^a	34 (64,2%) ^{a,b}	9 (17%) ^{a,b}	53 (47,3%) ^{a,b}	2 (4%) ^a	12 (24%) ^b	36 (72%) ^a	50 (44,6%) ^{a,b}

^{a, b} Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste chi-quadrado ($P < 0,05$). Bi = blastocisto inicial, Bl = blastocisto, Bx = blastocisto expandido, Be= Blastocisto eclodido. As porcentagens de cada estágio de blastocisto foram calculadas sobre o número total de blastocistos no dia de avaliação.

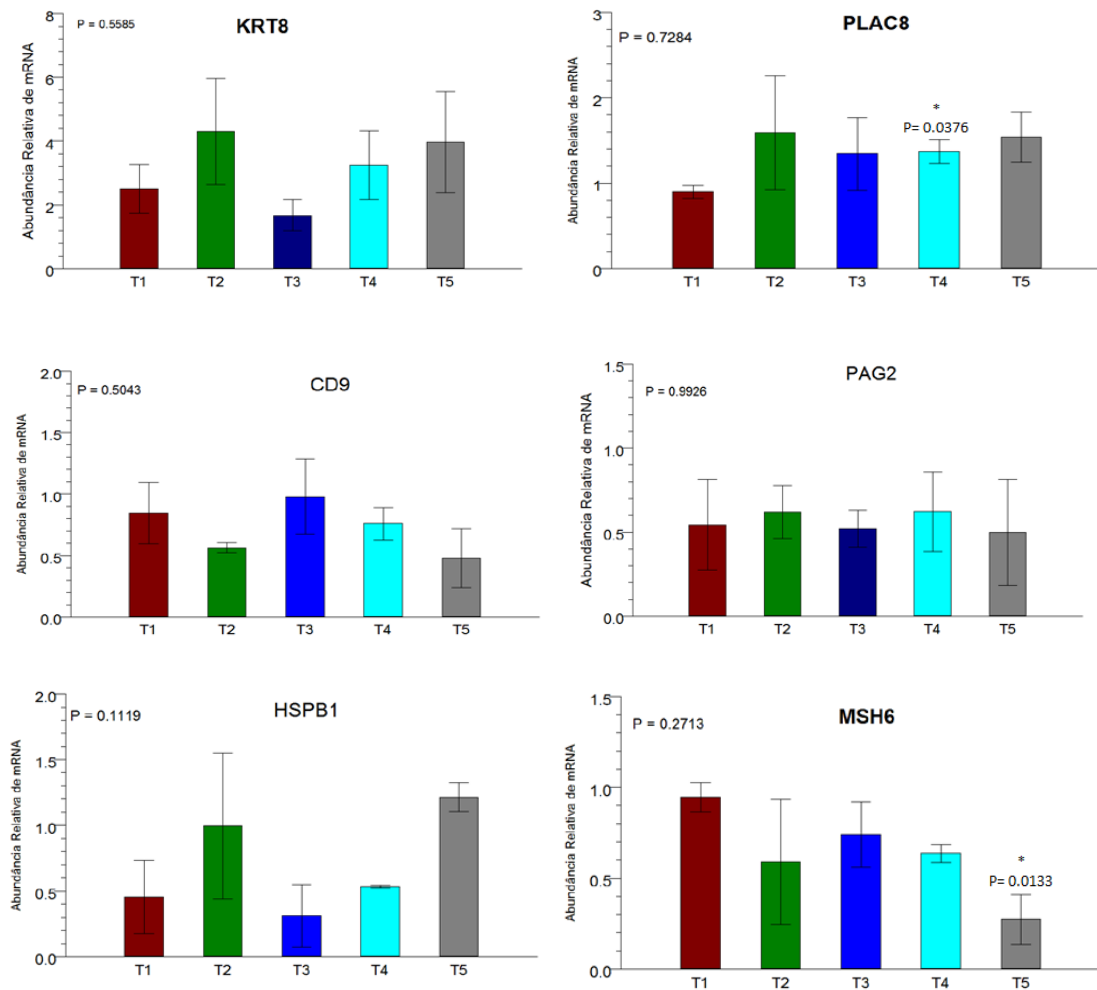


Figura 2.7. Nível de transcritos dos genes KRT8, PLAC8, CD9, PAG2, HSPB1 e MSH6 analisados por PCR em tempo real em embriões bovinos oriundos de complexos cumulus ovócitos pré - maturados na presença ou não de FGF10 e posteriormente maturados na presença ou não de FGF10. **T1** = controle; **T2** = grupo pré-MIV controle – MIV cotrole; **T3** = grupo pré-MIV controle – MIV FGF10; **T4** = grupo pré-MIV FGF10 – MIV controle e **T5** = grupo pré-MIV FGF10 – MIV FGF10. Cada grupo foi analisado utilizando-se três *pools* de blastocistos eclodidos de diferentes réplicas. Os dados (média \pm DPM) foram normalizados pelo gene ACTB e expressos em relação à amostra controle, através do método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência. Os dados foram analisados pelo teste Dunnett (controle versus cada um dos grupos) ($P < 0,05$).

5.3 Discussão

Considerando a importância da maturação *in vitro* para o sucesso da PIVE tanto em humanos como em animais, vários grupos de pesquisa têm conduzido seus estudos no intuito de melhorar o sistema de maturação *in vitro*. Um dos fatores responsáveis pela baixa produção de embriões é o fato dos CCOs utilizados nas TRAs constituírem uma

população heterogênea, com vários graus de competência. Portanto, uma das alternativas para melhorar os resultados da produção de embriões seria melhorar a qualidade dos ovócitos. Visando atender esse objetivo, esse estudo propôs melhorar as condições de cultivo e reter a meiose por um período, proporcionando aos ovócitos mais tempo para a aquisição de competência. Para melhorar as condições de cultivo durante a pré-maturação e/ou maturação foi escolhido o FGF10, que é um fator de crescimento produzido pelas células da teca (Buratini et al. 2007), que estão ausentes na MIV, e pelo ovócito. Além disso, receptores para esse fator de crescimento estão presentes nas células do *cumulus* e no ovócito (Zhang et al. 2010) e seus efeitos benéficos já foram relatados na PIVE bovina por Pomini Pinto et. al (2014) e Zhang et al. (2010).

Antes de avaliar os efeitos do FGF10 na PIVE, foi testado se o mesmo afetaria a progressão da meiose. Os resultados mostraram que o FGF10 não afetou a taxa de ovócitos em MII no final da maturação. Resultados semelhantes foram relatados por Zhang et al., (2010) quando utilizaram a mesma concentração de FGF10, da utilizada no presente estudo. Entretanto, um efeito benéfico do FGF10 na progressão da meiose foi observado quando altas concentrações foram utilizadas (Zhang et al., 2010; Pomini Pinto et al., 2014. Além disso, quando Zhang et al. (2010) adicionaram no meio anticorpos para bloquear a ação de qualquer FGF10 endógeno, observaram que a maturação nuclear não foi afetada, ou seja, a quantidade de FGF10 produzida pelo ovócito é muito pequena para produzir efeito na maturação nuclear.

Outros efeitos do FGF10 durante a MIV relatados na literatura, são o aumento na expansão dos CCOs (Zhang et al., 2010; Caixeta et al., 2013) e o aumento na produção de embriões. No estudo de Zhang, foi relatado que o bloqueio do FGF10 endógeno, ou seja, aquele que é produzido pelo ovócito, diminui a expansão dos CCOs e a produção embrionária. E que a suplementação de 0,5 ng/ml de FGF10 aumentou a expansão dos CCOs e a produção de embriões. Em contraste com esse achado, no presente estudo, foi observado que a suplementação do meio MIV com essa mesma concentração não aumentou nem a expansão dos CCOs nem a produção de embriões. O fato de Zhang et al. terem utilizado bFSH, hormônio que induz a expansão, além da suplementação do meio com PVA, pode ter possibilitado um aumento da expansão mesmo com uma concentração baixa de FGF10. Já Caixeta et al., que utilizaram pFSH e suplementaram o meio com BSA, só observaram o aumento na expansão com concentração mais alta (10 ng/mL), enquanto 0,5ng/ml não teve nenhum efeito. É bem possível que, no presente estudo, a presença de BSA e de FSH recombinante humano (rhFSH) tenha proporcionado a condição ideal para a expansão dos CCOs, mascarando um possível efeito do FGF10. De fato, o rFSH, devido a sua pureza, induz

uma maior expansão do que o pFSH, além de necessitar de concentrações muito inferiores para induzir a expansão (Ali & Sirad, 2005; Accardo et al., 2004).

A suplementação do meio de maturação com 0,5 ng/ml de FGF10 também não afetou nenhum parâmetro da qualidade embrionária, avaliada pela cinética de desenvolvimento e pela expressão dos genes PLAC8, KRT8, CD9, PAG2, HSPB1 e MSH6. Já Pomini Pinto et al. (2014), apesar de não terem detectado efeito do FGF10 na produção de embriões, concordando com os resultados deste estudo, observaram uma diminuição de ovócitos apoptóticos, fato que poderia melhorar a competência dos ovócitos e a qualidade embrionária. Entretanto, esses autores também não confirmaram a melhor qualidade dos embriões originados de ovócitos expostos ao FGF10.

A origem e a concentração do FSH talvez seja o fator mais importante para explicar a diferença nos resultados, já que o FGFR2B, principal receptor do FGF10, localizado nas células do *cumulus*, é regulado de modo dose dependente por FSH (Caixeta et al., 2013). Vários autores sugerem que as modificações nas células do *cumulus* sejam o alvo principal do FGF10 (Caixeta et al., 2013, Zhang et al. 2010, Pomini Pinto et al., 2014), e, provavelmente, essas modificações estão também relacionadas ao aumento na competência dos ovócitos. Como no presente estudo não foi observado efeito do FGF10 na expansão, que seria o efeito mais evidente, era de se esperar que o efeito na produção de embriões também não fosse detectado. Portanto, a adição deste fator durante a MIV convencional é desnecessária quando o meio é suplementado com BSA e rFSH. Os resultados de Pomini et al. (2014), de certa forma, confirmam essa hipótese, já que, mesmo em concentrações mais altas, o FGF10 não produziu incremento na produção de embriões e a diferença encontrada na expressão gênica foi apenas uma tendência ($p < 0,10$).

No segundo experimento, como alternativa para melhorar a qualidade do ovócito, foi utilizado um sistema de bloqueio da retomada meiótica associado à suplementação de FGF10. Esse sistema visou dar um tempo adicional aos ovócitos para que as mudanças que os tornam mais competentes possam ocorrer (Luciano et al., 2011). Para realizar esse bloqueio foi utilizada a cilostamida, um inibidor da PDE3, específica do ovócito e uma baixa dose de FSH durante a pré-maturação. Essa condição, de acordo com Luciano et al. (2011), permite a manutenção da funcionalidade das JG, contribuindo para aumentar a transcrição e o crescimento dos ovócitos. Após o período de pré-maturação, os ovócitos foram maturados com uma alta dose de FSH. A hipótese testada foi de que a presença do FGF10 durante esse período de pré-maturação poderia ter efeito positivo nos CCO, já que estaria suprindo o FGF10 produzido pelas células da teca que estariam ausentes durante esse período.

Da mesma forma que no experimento anterior, foi necessário verificar se o sistema de retenção utilizado estava sendo efetivo em bloquear os ovócitos em GV e qual o efeito do FGF10 durante esse período. Portanto, para avaliar a eficiência do bloqueio, e se a retenção não afetaria a cinética durante a maturação, os ovócitos foram analisados no final do período de retenção e durante a MIV pós-retenção. Os resultados mostraram que todos os tratamentos após a retenção, independente da adição de FGF10, foram semelhantes entre si com relação à porcentagem de GV, que foi em torno de 70%. Entretanto, esses tratamentos já apresentavam alguns ovócitos em estágio mais avançados de maturação nuclear (MI, AI, TI) quando comparados ao controle. Portanto, o sistema de bloqueio meiótico utilizado não foi totalmente eficiente e não foi influenciado pela suplementação de FGF10.

Sabemos que a retomada da meiose é influenciada diretamente pela comunicação bidirecional ovócito-células do *cumulus* via JG (Tsafriri et al., 1996; Luciano et al., 2014), e que o FSH age nas CCs estimulando a maturação ovocitária (Sirard et al., 2007), ocorrendo a quebra das junções GAP no decorrer do processo. Os CCOs de folículos de 3-8 mm possuem maior quantidade de receptor para FSH que CCOs de folículos menores, portanto, alguns CCOs poderiam então ter sido estimulados a retomar a meiose mesmo com uma dose baixa de rFSH. Outros fatores a serem considerados são: o tempo de bloqueio de 22 horas, bastante extenso, e ovócitos de folículos maiores são mais competentes em retomar a meiose. Possivelmente a dose de 10 μ m de cilostamida não foi suficiente para reter a meiose durante esse tempo, permitindo a retomada espontânea.

Entretanto, neste estudo, não foi observado expansão das CCs durante o período de retenção em nenhum dos tratamentos, apesar da presença de baixa dose de rFSH. Quando a expansão foi avaliada após a MIV foi observado que todos os grupos apresentaram, independente da adição de FGF10, expansão inferior ao controle. Como a dose de rFSH durante a MIV foi a mesma para todos os grupos, podemos supor que o longo período de retenção pode ter causado algum prejuízo às CC, que acabou afetando a expansão posterior. Para verificar se a adição de FGF10 nesse sistema afetaria a competência ovocitária, foi avaliada a produção embrionária até D8. O sistema, independente da adição do FGF10, não afetou a taxa de clivados em D2 nem a produção de blastocistos em D6 quando comparados ao controle. Entretanto, a pré-maturação, em alguns grupos, causou uma diminuição na produção de blastocisto em D7 e em D8, não havendo consistência em relação ao grupo que apresentava resultados semelhantes ou inferiores ao controle no D7 e D8. Foi observado também, que em D7 a pré-maturação acelerou o desenvolvimento dos embriões no grupo em que não foi adicionado FGF10 e no que foi adicionado apenas na MIV. Ou seja, esses grupos

apresentavam maior porcentagem de embriões em estágio mais avançado de desenvolvimento do que o controle. Considerando que embriões que se desenvolvem mais cedo têm maior chance de gerar prenhez (Florentino et al., 2013), pode-se inferir que a pré-maturação tenha um efeito benéfico na qualidade embrionária. Entretanto, como essa diferença não foi observada no D7 e no D8 em todos os tratamentos em que a pré-maturação foi realizada, outros estudos e avaliações devem ser feitos para que se possa confirmar esse efeito. Adicionalmente, não foi observada nenhuma diferença entre os tratamentos que foram submetidos à pré-MIV, portanto a suplementação de FGF10 nesse sistema não teve nenhum efeito benéfico.

Um aumento na expressão relativa do gene PLAC8 foi observado no tratamento onde só foi adicionado FGF10 na pré-maturação, em relação ao controle. Entretanto, esse tratamento produziu menores taxas de blastocistos totais em D7 e D8 do que o controle. Como esse gene está relacionado a sucesso na prenhez (Sayed et al., 2010) e já foi visto que o FGF10 tem uma tendência em aumentar a expressão desse gene (Pomini Pinto et al., 2014), possivelmente a adição de FGF10 apenas durante a pré-MIV possa melhorar a qualidade dos embriões.

No tratamento onde o FGF10 foi adicionado na pré-MIV e na MIV foi observado taxas de blastocistos totais em D7 e D8 similares ao controle. Nesse mesmo tratamento, foi também observada uma redução na expressão relativa de MSH6. Esse gene está relacionado com reparação de DNA, o que pode sugerir embriões de melhor qualidade, apesar da sua relação com a qualidade embrionária ainda não está bem estabelecida. Como em D8 não foi observada diferença entre as taxas de embriões eclodidos entre todos os tratamentos, pode-se supor que esse sistema de pré-maturação pode ser utilizado sem causar prejuízo na qualidade dos embriões.

Os parâmetros de qualidade embrionária utilizados neste trabalho não nos permitem concluir qual o melhor tratamento, pois o grupo apresentou maior expressão relativa de PLAC8, que é um gene relacionado à qualidade embrionária, por exemplo, apresentou menor taxa de embriões totais. Portanto, para que se possam ter informações mais seguras, outras avaliações devem ser feitas, como avaliar mais genes, número de células embrionárias e taxa de prenhez.

6. Conclusões

- A suplementação do meio MIV e/ou pré-MIV com 0,5 ng/ml de FGF10 não afeta a expansão das células do *cumulus* nem a produção embrionária.
- O sistema de pré-maturação utilizado neste estudo não aumenta a produção de embriões a partir de ovócito de folículos de 3-8 mm, porém, sugere uma aceleração no desenvolvimento embrionário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCARDO, C.; DATTENA, M.; PILICHI, S.; MARA, L.; CHESSA, B.; CAPPAL, P.. Effect of recombinant human FSH and LH on in vitro maturation of sheep oocytes; embryo development and viability. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p. 77–86, 2004.

ADONA, P.R.; LEAL, C. L. V.. Meiotic inhibition with different cyclin- dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. **Zygote**, v.12, p. 197-204, 2004.

AGHA, E. E.; ALAM, D. A.; CARRARO, G.; MACKENZIE, B.; GOTH, K., DE LANGHE, S. P.; VOSWINCKEL, R.; HAJIHOSSEINI, M. K.; REHAN, V. K.; BELLUSCI, S..Characterization of a Novel Fibroblast Growth Factor 10 (Fgf10) Knock-In Mouse Line to Target Mesenchymal Progenitors during Embryonic Development. **Plos one**, v. 7, n. 6, p. 3–10, 2012.

AGHA, E.E.; HEROLD, S.; ALAM, D. A.; QUANTIUS, J.; MACKENZIE, B.; CARRARO, G., MOISEENKO, A.; CHAO, C.; MINOO, P.; SEEGER, W.; BELLUSCI S..Fgf10 -positive cells represent a progenitor cell population during lung development and postnatally. **Development**, v. 141, p. 296–306, 2014.

ALANI, E.; CHI, N-W.; KOLODNER, R..The *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 protein specifically binds to duplex oligonucleotides containing mismatched DNA base pairs and insertions. **Genes Development**, v. 9, p. 234–247, 1995.

ALBUZ, F. K.; SASSEVILLE, M.; LANE, M.; ARMSTRONG, D.T.; THOMPSON, J.G.; GILCHRIST, R.B.. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction**, v. 25, n. 12, p. 2999–3011, 2010.

ALI, A.; SIRARD, M. A.. Protein kinases influence bovine oocyte competence during short-term treatment with recombinant human follicle stimulating hormone. **Reproduction**, v. 130, p. 303–310, 2005.

ASHKENAZI, H.; CAO, X.; MOTOLA, S.; POPLIKER, M.; CONTI, M.; TSAFRIRI, A.. Epidermal Growth Factor Family Members: Endogenous Mediators of the Ovulatory Response. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 77–84, 2014.

AUCLAIR, S.; UZBEKOV, R.; ELIS, S.; SANCHEZ, L.; KIREEV, I.; LARDIC, L.; DALBIES-TRAN, R.; UZBEKOVA, S.. Absence of cumulus cells during in vitro maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. **American journal of physiology endocrinology and metabolism**, v. 304, n. 6, p. 599–613, 2013.

BASHA, E.; FRIEDRICH, K. L.; VIERLING, E.. The N-terminal arm of small heat shock proteins is important for both chaperone activity and substrate specificity. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 52, p. 39943–52, 2006. BEG, M. A.; GINTHER, O. J.. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. **Reproduction**, v.132, p. 365-377, 2006.

BESSA, I.R.; NISHIMURA, R.C.; FRANCO, M.M., DODE, M.A.N.. Transcription Profile of Candidate Genes for the Acquisition of Competence During Oocyte Growth in Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v 48, p. 781–789, 2013.

BURATINI, J.; PINTO, M. G. L.; CASTILHO, A. C.; AMORIM, R.L.; GIOMETTI, I.C.; PORTELA, V.M., NICOLA, E.S.; PRICE, C.A.. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. **Biology of reproduction**, v. 77, n. 4, p. 743–50, 2007.

BILODEAU-GOESELS S.. Bovine Oocyte Meiotic Inhibition Before In Vitro Maturation and Its Value to In Vitro Embryo Production : Does it Improve Developmental Competence ? **Reproduction in domestic animals**, v. 47, p. 687–693, 2012.

CAIXETA, E. S.; SUTTON-MCDOWALL, M. L; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G.; CHRISTOPHER, A. P.; MACHADO, M. F.; LIMA, P. F.; BURATINI, J.. Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. **Reproduction**, v. 146, n. 1, p. 27–35, 2013.

CAIXETA, E.S.; MACHADO, M.F.; RIPAMONTE, P.; PRICE C.A.; BURATINI, J.: Effects of FSH on the expression of receptors for oocyte-- secreted factors and members of the EGF-- like family during in vitro maturation in cattle. **Reproduction Fertility and Development**, v. 25, p. 890–899, 2013

CARVALHO, M. E.; GASPARIN, G.; POLETI, M. D.; ROSA, A. F.; BALIEIRO, J. C. C.; LABATE, C. A.; NASSU, R. T.; TULLIO, R. R.; REGITANO, L. C. A.; MOURÃO, G. B.; COUTINHO, L. L... Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle , a *Bos indicus* breed. **Met science**, v. 96, n. 3, p. 1318–1324, 2014.

CASTILHO, A. C. S.; DA SILVA, R. B.; PRICE, C.; MACHADO, M.F.; AMORIM, R.L.; BURATINI, J.. Expression of fibroblast growth factor 10 and cognate receptors in the developing bovine ovary. **Theriogenology**, v. 81, n. 9, p. 1268–74, 2014.

CASTILHO, A. C. S.; GIOMETTI, I. C.; BERISHA, B.; SCHAMS, D., PRICE, C.A., AMORIM R.L.; PAPA, P.C.; BURATINI, JR J.. Expression of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in the bovine corpus luteum. **Molecular reproduction and development**, v. 75, n. 5, p. 940–5, 2008.

CHAVES, R. N.; LIMA-VERDE, I. B.; CELESTINO, J. J. H.; DUARTE, A.B.G.; ALVES, A.M.C.V.; MATOS, M.H.T.; CAMPELLO, C.C.; NAME, K.P.O.; BÁO, S.N.; BURATINI, J.; FIGUEIREDO, J.R.. Fibroblast growth factor-10 maintains the survival and promotes the growth of cultured goat preantral follicles. **Domestic animal endocrinology**, v. 39, n. 4, p. 249–58, 2010.

CHEN, C.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W.. Fibroblast Growth Factor-10: A Stromal Mediator of Epithelial Function in the Ovine Uterus. **Biology of reproduction**, v. 63, p. 959–966, 2000.

CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J.; SU, Y.. Role of the Epidermal Growth Factor Network in Ovarian Follicles. **Molecular endocrinology**. v. 20, n. December, p. 715–723, 2014.

DAILEY, L.; AMBROSETTI, D.; MANSUKHANI, A.; BASILICO, C.. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 16, p. 233–247, 2005.

DIECI, C.; LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; LAGUTINA, I.; TESSARO, I.; MODINA, S. C.; ALBERTINI, D. F.; LAZZARI, G.; GALLI, C.; LUCIANO, A. M..The effect of cilostamide on gap junction communication dynamics, chromatin remodeling, and competence acquisition in pig oocytes following parthenogenetic activation and nuclear transfer. **Biology of reproduction**, v. 89, n. 3, p. 68, 2013.

DODE, M.A.; 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.

EL-HALAWANY, N.; PONSUKSILI. S.; WIMMERS, K.; GILLES, M.; TESFAYE, D.; SCHELLANDER, K.. Quantitative expression analysis of blastocyst- derived gene transcripts in preimplantation developmental stages of in vitro-produced bovine embryos using real-time polymerase chain reaction technology. **Reproduction Fertility and Development**, v. 16, p.753–762, 2005.

EL-SAYED, A.; HOELKER, M.; RINGS, F.; SALILEW, D.; JENNEN, D.; THOLEN, E.; SIRARD, M. A.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D.. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiological Genomics**, v. 28, p. 84– 96, 2006.

ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S.. The Role of the Oocyte in Folliculogenesis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 11, n. 5, 2000.

ESWARAKUMAR, V. P.; LAX, I.; SCHLESSINGER, J.. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. **Cytokine growth factor reviews**, v. 16, p. 139–149, 2005.

FANELLI, M. A.; CARIÓN, F. D.C.; DEKKER, J.; SHOEMAKER, J.; CIOCCA, D. R.. Serological Detection of Heat Shock Protein in Normal and Breast Cancer Patients. **Cancer epidemiology, biomarkers and prevention**, v. 7, p. 791–795, 1998.

FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S.. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and

biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836–48, 2009.

FIELDS, S. D.; HANSEN, P. J.; EALY, A. D.. Fibroblast growth factor requirements for in vitro development of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 75, n. 8, p. 1466–75, 2011.

FORTUNE, J. E.; SIROIS, J.. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of reproduction**, v. 39, p. 308–317, 1988.

FRANCK, E.; MADSEN, O.; RHEEDE, V. T.; RICARD, G.; HUYNEN, M. A.; JONG, W. W.. Evolutionary diversity of vertebrate small heat shock proteins. **Journal of molecular evolution**, v. 59, n. 6, p. 792–805, 2004.

GALAVIZ-HERNANDEZ, C.; STAGG, C.; RIDDER, G.; TANAKA, T. S., KO, M. S.H., SCHLESSINGER, D.; NAGARAJA, R.. Plac8 and Plac9 , novel placental-enriched genes identified through microarray analysis. **Gene**, v. 309, p. 81–89, 2003.

GARCIA-ISPIERTO, I.; ALMERIA, S.; SERRANO, B.; SOUSA, N.M., BECKERS, J.F.; LOPEZ-GATIUS F.. Plasma Concentrations of Pregnancy-Associated Glycoproteins Measured Using Anti-Bovine PAG-2 Antibodies on Day 120 of Gestation Predict Abortion in Dairy Cows Naturally Infected with *Neospora caninum*. **Reproduction in domestic animals**, v. 618, p. 613–618, 2013.

GASPERIN, B. G.; FERREIRA, R.; ROVANI, M. T.; SANTOS J. T.; BURATINI, J.; PRICE, C. A.; BAYARD, P. D. G.. FGF10 inhibits dominant follicle growth and estradiol secretion in vivo in cattle. **Reproduction**, v. 143, p. 815-823, 2012.

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

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

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

GINTHER, O.J.; BEG, M.a.; DONADEU, F.X.; *et al.* Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 239–257, 2003.

GOMEZ, E.; GUTIERREZ-ADAN, A.; DIEZ, C.; BERM-EJO ALVAREZ, P.; MUNOZ, M.; RODRIGUEZ, A.; OTERO, J.; ALVAREZ-VIEJO, M.; MARTIN, D.; CARROCERA, S.; CAAMANO, J.N.. Biological differences between in vitro produced bovine embryos and parthenotes. **Reproduction**, v. 137, p. 285–295, 2009.

GOOVAERTS, I.G.F.; LEROY, J.L.M.R.; RIZOS, D.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; JORSSEN, E.P.A.; BOLS, P.E.J. Single in vitro bovine embryo

production: Coculture with autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and gene expression profile. **Theriogenology**, v. 76, p. 1293–1303, 2011.

GUEMRA, S.; SILVA SANTO, E.; ZANIN, R.; MONZANIA, P. S., SOVERNIGO, T. C., OHASHI, O. M.; LEAL, C. L. V., ADONA P. R.. Effect of temporary meiosis block during prematuration of bovine cumulus-oocyte complexes on pregnancy rates in a commercial setting for in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 81, n. 7, p. 982–7, 2014.

GUIMARÃES, A. L. S.; PEREIRA S.A.; LEME, L.O.; DODE, M.A.N.. Theriogenology Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine in vitro embryo production, **Theriogenology**, v. 83, n. 1, p. 52–57, 2015.

GUTIERREZ, C. G.; CAMPBELL, B. K.; 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. 616, p. 608–616, 1997.

GUTIERREZ-ADAN, A.; RIZOS, D.; FAIR, T.; MOREIRA, P.N.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P.. Effect of Speed of Development on mRNA Expression Pattern in Early Bovine Embryos Cultured In Vivo or In Vitro. **Molecular reproduction and development**, v. 68, p. 441–448, 2004.

GRAF, A.; KREBS, S.; HEININEN-BROWN, M.; ZAKHARTCHENKOC, V.; BLUMA, H.; WOLF, E.. Genome activation in bovine embryos: review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. **Animal reproduction science**, v. 149, n. 1-2, p. 46–58, 2014.

GREEN, J.; PARKS, T. E.; AVALLE, M. P.; TELUGUA. B. P.; MCLAINA, A. L.; PETERSONB, A. J.; MCMILLANB, W.; MATHIALAGANC, N.; HOOKD, R. R.; XIE, S.; ROBERTS, R. M.. The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1481–503, 2005.

HEMBERGER, M.; CROSS, J. C.. Genes governing placental development. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 12, n. 4, p. 162–168, 2001.

HOLM, P.; SHUKRI, I. N.N.; VAJTA, G.; BOOTH, P.; BENDIXEN, C.; CALLESEN H.. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. **Theriogenology**, p. 1285- 99, 1998.

HOSOE, M.; SHIOYA, Y.. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote**, v. 5, p. 371–6, 1997.

HUANG, W.; NAGANO, M.; KANG, S.; YANAGAWA, Y.; TAKAHASHI Y.. Prematurational Culture with 3-Isobutyl-1-methylxanthine Synchronizes Meiotic Progression of the Germinal Vesicle Stage and Improves Nuclear Maturation and Embryonic Development in In Vitro -grown Bovine Oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 60, n. 1, p. 9-13 , 2014.

HUANG, W.; NAGANO, M.; KANG, S.. Effects of in vitro growth culture duration and prematuration culture on maturational and developmental competences of bovine oocytes derived from early antral follicles. **Theriogenology**, v. 80, n. 7, p. 793–9, 2013.

HUNTER, M. G.; ROBINSON, R. S.; MANN, G. E.. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. **Animal reproduction science**, v. 82-83, p. 461–77, 2004.

IGARASHI, M.; FINCH, P. W.; AARONSON S.A.. Characterization of Recombinant Human Fibroblast Growth Factor (FGF) -10 Reveals Functional Similarities with Characterization of Recombinant Human Fibroblast Growth Factor (FGF) -10 Reveals Functional Similarities with Keratinocyte Growth Factor (FGF-7). **The journal of biological chemistry**, v. 273, n. 21, p. 13230–35, 1998.

ITOH, N.; ORNITZ, D. M.. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. **Trends in genetics** v. 20, n. 11, p. 14–20, 2004.

IYER, S. V.; DANGE, P. P.; ALAM, H.. Understanding the Role of Keratins 8 and 18 in Neoplastic Potential of Breast Cancer Derived Cell Lines. **Plos one**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2013.

JACKSON, B.W.; GRUND, C.; SCHMID, E.; BURKI, K.; FRANKE, W.W.. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. Intermediate filaments of the cytokeratin type and desmosomes in preimplantation embryos. **Differentiation**, v.17, p. 161–179, 1980.

JAQUEMAR, D.; KUPRIYANOV, S.; WANKELL, M.; AVIS, J.; BENIRSCHKE, K.; BARIBAULT, H.; OSHIMA, R.G.. Keratin 8 protection of placental barrier function. **Journal Cell Biology**. v. 161, p. 749–56, 2003.

JESETA, M.; CTVRTLÍKOVÁ KNITLOVÁ, D.; HANZALOVÁ, K.. Mitochondrial patterns in bovine oocytes with different meiotic competence related to their in vitro maturation. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 49, n. 3, p. 469–75, 2014.

JIMENEZ-PREITNER, M.; BERNEY, X.; THORENS, B.. Plac8 is required for White Adipocyte Differentiation in vitro and Cell Number Control in vivo. **Plos one**, v. 7, n. 11, 2012.

JIMENEZ-PREITNER, M.; BERNEY, X.; ULDRY, M.. Article Plac8 Is an Inducer of C / EBP b Required for Brown Fat Differentiation , Thermoregulation , and Control of Body Weight. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 5, p. 658–670, 2011.

KLEIN, C.; BAUERSACHS, S.; ULBRICH, S.E.; EINSPANIER, R.; MEYER, H.H.D.; SCHMIDT, S.E.M.; REICHENBACH, H.D.; VERMEHREN, M.; SINOWATZ, F.; BLUM, H.. Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the pre-attachment period. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 253–264, 2006.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C.. Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 165–183, 2003.

KUBELKA M.; MOTILK. J.; SCHULTZ. R.M.; PAVLOK. A.. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 292–302, 2000.

LEDFORD, J. G.; KOVAROVA, M.; KOLLER, B. H. Impaired Host Defense in Mice Lacking ONZIN. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 8, p. 5132–5143, 2007.

LI, C.; MA, H.; WANG, Y.; CAO, Z.. Excess PLAC8 promotes an unconventional ERK2-dependent EMT in colon cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 5, 2014.

LIANG, C.; SU, Y.; FAN, H.. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 21, n. 9, p. 2037–55, 2007.

LIBAULT, M.; STACEY, G.. Evolution of FW2.2-like (FWL) and PLAC8 genes in eukaryotes. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 10, p. 1226–1228, 2010.

LIMBURG, P. J.; HARMSSEN, W. S.; CHEN, H. H.. DNA Mismatch Repair Gene Alterations in a Population-Based Sample of Young-Onset Colorectal Cancer Patients. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 9, n. 6, p. 497–502, 2012.

LIU, Y.; SUI, H.; WANG, H.; YUAN, J.. Germinal Vesicle Chromatin Configurations of Bovine Oocytes. **Microscopy research and technique**, v. 69, p. 799–807, 2006.

LIU, W. M., CAO, Y.J.; YANG, Y.J.; LI, J.; HU, Z.; DUAN, E-K.. Tetraspanin CD9 regulates invasion during mouse embryo implantation. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 36, p. 121–130, 2006.

LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; TESSARO, I.. Role of gap junction-mediated communications in regulating large-scale chromatin configuration remodeling and embryonic developmental competence acquisition in fully grown bovine oocyte. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 30, n. 9, p. 1219–26, 2013.

LODDE, V.; MODINA, S.; GALBUSERA, C.. Large-Scale Chromatin Remodeling in Germinal Vesicle Bovine Oocytes: Interplay With Gap Junction Functionality and Developmental Competence. **Molecular reproduction and development**, v. 749, p. 740–749, 2007.

LODDE, V.; MODINA, S.; MADDOX-HYTTEL, P.. Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. **Molecular reproduction and development**, v. 75, n. 5, p. 915–24, 2008.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A.C.. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 137–152, 2006.

LUCCI, C.M.; RUMPF, R; FIGUEIREDO, J.R.; BÁO, S.N.. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, v. 15, p.1467-1483, 2002.

LUCIANO, A. M.; FRANCIOSI, F.; DIECI, C.; LODDE, V.. Changes in large-scale chromatin structure and function during oogenesis: A journey in company with follicular cells. **Animal reproduction science**, v. 149, n. 1-2, p. 3–10, 2014.

LUCIANO, A. M.; FRANCIOSI, F.; MODINA, S. C.. Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism(s). **Biology of reproduction**, v. 85, n. 6, p. 1252–9, 2011.

LUCIANO, A. M.; LODDE, V.; BERETTA, M. S.. Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-culture system with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glutathione. **Molecular reproduction and development**, v. 71, n. 3, p. 389–97, 2005.

MACAULAY, D.; GILBERT, I.; CABALLERO, J.. The Gametic Synapse; RNA Transfer to the Bovine Oocyte. **Biology of reproduction**, 2014.

MACHADO, G. M.; CAIXETA, E. S.; LUCCI, C. M RUMPF. R.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N.. Post-hatching development of bovine embryos in vitro: the effects of tunnel preparation and gender. **Zygote**, p. 1-12, 2011.

MADDOX-HYTTEL, P.; ALEXOPOULOS, N.I.; VAJTA, G.; LEWIS, I.; ROGERS, P.; CANN, L.; CALLESEN, H.; TVEDEN-NYBORG, P.; TROUNSON, A.. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. **Reproduction**, v. 125, p. 607–23, 2003.

MAECKER H. T.; TODD, S. C.; LEVY, S.. The tetraspanin facilitators. **The faseb journal**, V.11, P.428 – 442, 1997.

MAGIN, T. M.; VIJAYARAJ, P.; LEUBE, R. E.. Structural and regulatory functions of keratins. **Experimental cell research**, v. 313, n. 10, p. 2021-32, 2007.

MCLAUGHLIN, E.; MCIVER, S. C.. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. **Reproduction**, v. 137, n. 1, p. 1–11, 2009.

MEHLMANN, L. M., SAEKI, Y.,2. TANAKA, S., BRENNAN, T. J., EVSIKOV, A, V.. The Gs-Linked Receptor GPR3 Maintains Meiotic Arrest in Mammalian Oocytes. **SCIENCE**, V. 306, 1947-50, 2004.

KAJIMURA, S.; SEALE, P.; SPIEGELMAN, B. M. Transcriptional Control of Brown Fat Development. **Cell metabolism**, v. 20, n. 2, p. 79–91, 2011.

MENEZO, Y.; RUSSO, G.; TOSTI, E.. Expression profile of genes coding for DNA repair in human oocytes using pangenomic microarrays, with a special focus on ROS linked decays. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 24, n. 11, p. 513–20, 2007.

MIHM, M.; AUSTIN, E.J.. The final stages of dominant follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 155–166, 2002.

MOURTADA-MAARABOUNI, M.; WATSON, D.; MUNIR, M.. Apoptosis Suppression by Candidate Oncogene PLAC8 is Reversed in Other Cell Types. **Current Cancer Drug Targets**, v.13, p. 80–91, 2013.

NAOUR, F. L.; RUBINSTEIN, E.; JASMIN, C.. Severely Reduced Female Fertility in CD9-Deficient Mice. **Science**, v. 287, p. 319–321, 2000.

NOGUEIRA, D.; RON-EL, R.; FRIEDLER, S.. Meiotic arrest in vitro by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. **Biology of reproduction**, v. 74, n. 1, p. 177–84, 2006.

ODAKA, C.; LORANGER, A.; TAKIZAWA, K.. Keratin 8 Is Required for the Maintenance of Architectural Structure in Thymus Epithelium. **Plos one**, v. 8, n. 9, 2013.

ORON, G.; FISCH, B.; ZHANG, X. Y.; GABBAY-BENZIV, R.; KESSLER-ICEKSON, G.; KRISSE, H.; BEN-HAROUSH, A.; AO, A.; ABIR R.. Fibroblast growth factor 10 in human ovaries. **Reproductive biomedicine online**, v. 25, n. 4, p. 396–401, 2012.

OROZCO-LUCERO, E.; DUFORT, I.; ROBERT, C.; SIRARD, M.. Rapidly Cleaving Bovine Two-Cell Embryos Have Better Developmental Potential and a Distinctive mRNA Pattern. **Molecular Reproduction & Development**, v.81, p.31–41, 2014.

PFAFFL, M.W.. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002–2007, 2001.

PALOMBO, F.; GALLINARI, P.; IACCARINO, I.; LETTIERI, T.; HUGHES, M.; D'ARRIGO, A.. GTBP a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. **Science**, v. 268, p. 1912–1914, 1995.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L.. Effect of bovine sperm separation by either swim-up and Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, p. 859–69, 1995.

PARK, J.; SU, Y.; ARIGA, M.. EGF-Like Growth Factors As Mediators of LH Action in the Ovulatory Follicle. **Science**, V. 303 p. 682–684, 2004.

PFISTER-GENSKOW, M.; MYERS, C.; CHILDS, L.A.; LACSON, J.C.; PATTERSON, T.; BETTHAUSER, J.M.; GOUELEKE, P.J.; KOPPANG, R.W.; LANGE, G.; FISHER, P.; WATT, S.R.; FORSBERG, E.J.; ZHENG, Y.; LENO, G.H.; SCHULTZ, R.M.; LIU, B.; CHETIA, C.; YANG, X.; HOESCHELE, I.; EILERTSEN, K.J.. Identification of differentially expressed genes in individually bovine preimplantation embryos produced by nuclear transfer: improper reprogramming of genes required for development. **Biology of Reproduction**, v.71, p. 546–55, 2005.

POMINI PINTO, R.F.; FONTES, P.K.; LOUREIRO, B.; CASTILHO, A.C.S.; TICIANELLI, J. S.. Effects of FGF10 on Bovine Oocyte Meiosis Progression, Apoptosis, Embryo Development and Relative Abundance of Developmentally Important Genes In Vitro. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, p. 1–7, 2014.

PONTES, J. H. F., NONATO-JUNIOR I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M.. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 690–7, 2009.

PONTES, J. H.; MELO STERZAB, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R; SANCHES, B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M.. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, n. 9, p. 1640–6, 2011.

PORTELA, V. M.; DIRANDEH, E.; GUERRERO-NETRO, H. M.; ZAMBERLAM, G.; BARRETA, M. H.; GOETTEN, A. F., PRICE, C. A.. The role of fibroblast growth factor-18 in follicular atresia in cattle 1 Running title: FGF18 and granulosa apoptosis. **Biology of reproduction**, v. 92, n.1 14, p. 1-8, 2015.

RICHARDS, J. S.. Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 234, n. 1-2, p. 75–9, 2005.

RICHARDS, J. S.; RUSSELL, D. L.; ROBKER, R. L.. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, n. 1-2, p. 47–54, 1998.

RIZOS, D., LONERGAN, P., BOLAND, M.P., ARROYO-GARCIA, R., PINTADO, B., DE LA FUENTE, J., GUTIERREZ-ADAN, A.. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 589–95, 2002.

ROSE, R. D.; GILCHRIST, R. B.; KELLY, J. M.; THOMPSON, J. G., SUTTON-MCDOWALL, M. L., Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators . **Theriogenology**, v.79, p. 142–148, 2013.

RUI, Z.; JIAN-GUO, J.; YUAN-PENG, T. Use of serological proteomic methods to find biomarkers associated with breast cancer. **Proteomics**, v. 3, n. 4, p. 433–9, 2003.

SCHWARZ, K. R. L.; PIRES, P. R. L.; MESQUITA, L. G.. Effect of nitric oxide on the cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway during meiosis resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 81, n. 4, p. 556–64, 2014.

SHU, Y.; ZENG, H.; REN, Z.. ZHUANG, G..Effects of cilostamide and forskolin on the meiotic resumption and embryonic development of immature human oocytes. **Human reproduction**, v. 23, n. 3, p. 504–513, 2008.

SIRARD, M.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M.. In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**, v. 68, p. 72-76, 2007.

SKINNER, M. K.. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Human reproduction update**, v. 11, n. 5, p. 461–471, 2005.

SPICER, L. J.; AAD, P. Y.; ALLEN, D. T.. Growth differentiation factor 9 (GDF9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by bovine theca cells: influence of follicle size on responses to GDF9. **Biology of reproduction**, v. 78, n. 2, p. 243–53, 2008.

SUGIMURA, S.; RITTER, L. J.; SUTTON-MCDOWALL, M. L.. Amphiregulin co-operates with bone morphogenetic protein 15 to increase bovine oocyte developmental competence: effects on gap junction-mediated metabolite supply. **Molecular human reproduction**, v. 20, n. 6, p. 499–513, 2014.

SULLIVAN, R.; CABALLERO, J. N.; FRENETTE, G.. CD9-Positive Microvesicles Mediate the Transfer of Molecules to Bovine Spermatozoa during Epididymal Maturation. **Plos one**, v. 8, n. 6, 2013.

SUGIMURA, S.; RITTER, L. J.; SUTTON-MCDOWALL, M. L.; MOTTERSHEAD, D. G., THOMPSON, J. G.; GILCHRIST R. B.. Amphiregulin co-operates with bone morphogenetic protein 15 to increase bovine oocyte developmental competence: effects on gap junction-mediated metabolite supply. **Molecular human reproduction**, v. 20, n. 6, p. 499–513, 2014.

SUN, J.; LI, X.. Growth and antrum formation of bovine primary follicles in long-term culture in vitro. **Reproductive Biology**, v. 13, n. 3, p. 221–228, 2013.

SZAFRANSKA, B.; PANASIEWICZ, G. , MAJEWSKA, M.. Biodiversity of multiple Pregnancy-Associated Glycoprotein (PAG) family: gene cloning and chorionic protein purification in domestic and wild eutherians (Placentalia) – a review. **Reproduction Nutrition Development**, v. 5, p. 481–502, 2006.

TANAKA, Y.; NAKADA, K.; MORIYOSHI, M.; SAWAMUKAI Y.. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. **Reproduction**, v.121, p. 777–782, 2001.

TAN, J.; WANG, H.; SUN, X.; LIU, Y.. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. **Molecular human reproduction** v. 15, n. 1, p. 1–9, 2009.

TAO, G.; LOOI, K.; TOIVOLA, D. M.; STRNAD, P.; ZHOU Q.. Keratins, modulate the shape and function of hepatocyte mitochondria : a mechanism for protection from apoptosis. **Journal of cell science**, v.122, n.21, p. 3851 – 55, 2009.

THOMAS, R. E.; THOMPSON, J. G.; ARMSTRONG, D. T.. Effect of Specific Phosphodiesterase Isoenzyme Inhibitors During In Vitro Maturation of Bovine Oocytes on Meiotic and Developmental Capacity. **Biology of reproduction**, v. 71, p. 1142–1149, 2004.

TOIVOLA, D.M.; STRNAD, P.; HABTEZION, A.; OMARY, M.B.. Intermediate filaments take the heat as stress proteins. **Trend Cell Biology**, v. 20, n. 2, p. 79-91.

TOUZARD, E.; REINAUD, P.; DUBOIS, O.. Specific expression patterns and cell distribution of ancient and modern PAG in bovine placenta during pregnancy. **Reproduction**, v. 146, p. 347-362, 2013.

TRIPATHI, A.; KUMAR, K. V. P.; CHAUBE, S. K. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. **Journal of cellular physiology**, v. 223, n. 3, p. 592–600, 2010.

TSAFRIRI, A.; CHUN, S.; ZHANG, R.. Oocyte Maturation Involves Compartmentalization and Opposing Changes of cAMP Levels in Follicular Somatic and Germ Cells : Studies Using Selective Phosphodiesterase Inhibitors. **Developmental Biology**, v. 402, p. 393–402, 1996.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J.. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717–51, 2005.

VAMDESOMPELE, J.; PRETER, K. D.; PATTYN, F.; POPPE, B.; ROY, N. V.; PAEPE, A.; SPELEMAN, F.. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, vol. 3, n. 7, p.1-12, 2002.

VANHOUTTE, L.; SUTTER, P.; NOGUEIRA, D.; GERRIS, J. A. N.. Nuclear and cytoplasmic maturation of in vitro matured human oocytes after temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor. **Human Reproduction**, Vol. 22, N. 5, p. 1239–1246, 2007.

VANHOUTTE, L.; NOGUEIRA, D.; GERRIS, J. A. N.. Effect of Temporary Nuclear Arrest by Phosphodiesterase 3-Inhibitor on Morphological and Functional Aspects of In Vitro Matured Mouse Oocytes. **Molecular reproduction and development**, v. 175, p. 1021–1030, 2008.

VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHAO, M.P.; CAMARGO, L.S.A.. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Animal Reproduction**, v.9, p.12-18, 2012.

WRENZYCKI, C; STINSHOFF, H.. Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 48 Suppl 1, p. 38–43, 2013.

WU, R.; KAUSAR, H.; JOHNSON, P.. Hsp27 regulates Akt activation and polymorphonuclear leukocyte apoptosis by scaffolding MK2 to Akt signal complex. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 30, p. 21598–608, 2007.

XIANG, W.; MACLAREN, L. A.. Expression of Fertilin and CD9 in Bovine Trophoblast and Endometrium During Implantation. **Biology of reproduction**, v. 66, p. 1790–1796, 2002.

XIE, S.; GREEN, J.; BIXBY J. B.; SZAFRANSKA, B.; DEMARTINI, J. C.. The diversity and evolutionary relationships of the pregnancy-associated glycoproteins, an aspartic proteinase subfamily consisting of many trophoblast-expressed genes. **Biochemistry**, v. 94, p. 12809–12816, 1997.

ZENG, H.; RICHANI, D.; SUTTON-MCDOWALL, M. L.. Prematuration with Cyclic Adenosine Monophosphate Modulators Alters Cumulus Cell and Oocyte Metabolism and Enhances Developmental Competence of In Vitro- Matured Mouse Oocytes. **Biology of reproduction** v. 91, p. 1–11, 2014.

ZHANG, K.; HANSEN, P. J.; EALY, A. D.. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. **Reproduction**, v. 140, n. 6, p. 815–26, 2010.

ZHANG, M.; OUYANG, H.; XIA, G.. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. **Molecular human reproduction**, v. 15, n. 7, p. 399–409, 2009.

ZHANG, K; EALY, D.. Disruption of fibroblast growth factor receptor signaling in bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation reduces subsequent embryonic development. **Domestic animal endocrinology**, v. 42, n. 4, p. 230–8, 2012.

ZHONG, W; WANG, Q. T.; SUN, T.; WANG, F.; LIU, J.; LEACH, R.; JOHNSON, A.; PUSCHECK, E.E.; RAPPOLEE, D.A.. FGF ligand family mRNA expression profile for mouse preimplantation embryos, early gestation human placenta, and mouse trophoblast stem cells. **Molecular reproduction and development**, v. 73, n. 5, p. 540–50, 2006.

ZHOU, G.; LIU, G.; MENG, Q.. Tetraspanin CD9 in Bovine Oocytes and Its Role in Fertilization. **Journal of Reproduction and Development**, v. 55, n. 3, p. 305–308, 2009.

ZHOU, G.; ZENG, Y. A. N.; MENG, Q.. Decreased Expression of CD9 in Bovine Oocytes After Cryopreservation and the Relationship to Fertilization Capacity. **Molecular reproduction and development**, v. 80, p. 451–459, 2013

ZUCCOTTI, M.; MERICO, V.; CECCONI, S.; What does it take to make a developmentally competent mammalian egg? **Human reproduction update**, v. 17, n. 4, p. 525–40, 2011.