

**Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**EFEITO DE UM MEIO CONDICIONADO POR
CÉLULAS DO *CUMULUS OOPHORUS* DE BOVINOS
NA MATURAÇÃO E NO POTENCIAL DE
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO *IN VITRO*
DE OÓCITOS DESNUDOS**

Isabela Maria Alves de Ávila

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2017**

Isabela Maria Alves de Ávila

**EFEITO DE UM MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS DO *CUMULUS*
OOPHORUS DE BOVINOS NA MATURAÇÃO E NO POTENCIAL DE
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO *IN VITRO* DE OÓCITOS DESNUDOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Antônio Pinho de Marques Junior

Coorientador: Luiz Sérgio de Almeida Camargo
(EMBRAPA Gado de leite)

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2017**

Ávila, Isabela Maria Alves de, 1974-
A958e Efeito de um meio condicionado por células do *Cumulus oophorus* de bovinos na maturação e no potencial de desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos desnudos / Isabela Maria Alves de Ávila. – 2017.
79 p. : il.

Orientador: Antônio Pinho de Marques Junior
Coorientador: Luiz Sérgio de Almeida Camargo
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino – Teses. 2. Embrião – Teses. 3. Oócitos – Teses. 4. Cumulus oophorus – Teses.
5. Reprodução animal – Teses. I. Marques Junior, Antônio Pinho de. II. Camargo, Luiz Sérgio de Almeida. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

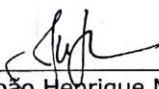
CDD – 636.208 926

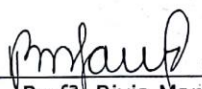
FOLHA DE APROVAÇÃO
ISABELA MARIA ALVES DE ÁVILA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração REPRODUÇÃO ANIMAL.

Aprovada em 31 de Agosto de 2017, pela banca constituída pelos membros:


 Prof. Antônio de Rinho Marques Júnior
 Presidente - Orientador


 Dr. João Henrique Moreira Viana
 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA


 Profª Rivia Mara Lamaita
 Faculdade de Medicina - UFMG

“Não há ventos favoráveis para quem não sabe para onde vai...” Sêneca

AGRADECIMENTOS

Aos meus amores, Jacob e Luca, por todo o apoio, paciência, amor, e por me fazerem extremamente feliz...

À minha irmã querida, que me ajudou a “encontrar o caminho” na veterinária;

Aos meus pais e irmão, por me apoiarem sempre; ao meu pai, por ter criado um projeto chamado Fazenda Raiz, que me levou por esta estrada;

Ao meu querido orientador, professor Pinho, grande amigo, pessoa, profissional;

A todos os parceiros e amigos do Laboratório de Fertilização *in vitro* da Escola de Veterinária da UFMG: agradecimento especial ao professor Alan, Eliane, Nat, Carol, João, Phillipe, Pedro, Valquíria, Luciano e a todos os estagiários que por lá passam e nos ajudam sempre;

Ao Emílio, por ter me ajudado imensamente neste projeto nas etapas da maturação oocitária;

Ao laboratório de Microscopia Confocal da Universidade Federal de Uberlândia, com agradecimento especial à Mariani, pela excelente pessoa e profissional que é;

Ao Centro de Microscopia eletrônica da UFMG, com agradecimento especial à Altair e Marilene;

Ao meu Coorientador, professor Luiz Sérgio, pela ajuda e disponibilidade, mesmo de longe;

Ao Virgílio, que com certeza será um grande veterinário, pela ajuda, pela parceria e pelos ensinamentos!

Aos caros professores Joao Henrique e Rivia Lamaita, por aceitarem participar da banca avaliadora; já agradeço de antemão pela contribuição ao projeto;

Aos meus queridos amigos e colegas da pós-graduação, pela ajuda direta ou indireta; foram dois anos muito enriquecedores;

À Laíse, minha cara aluna de iniciação científica, de mil ocupações, pouco tempo, mas de uma boa vontade infinita;

À professora Joana, que, mesmo com o pouco tempo disponível, realizou as análises estatísticas do projeto com presteza;

Ao professor Jenner, caro amigo, pela ajuda com os cultivos celulares;

Aos frigoríficos Frigobet e Hipercarnes, com agradecimento especial à Elisa e ao William, por toda a boa vontade e ajuda com a coleta dos ovários;

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudos;

À Escola de Veterinária da UFMG e ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal; passei dias maravilhosos nesta escola ao longo dos últimos anos;

A todos aqueles que foram e estão sendo parte deste momento: MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

	RESUMO	10
	ABSTRACT	11
1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS	13
3.	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1	FOLICULOGÊNESE	14
3.2	O <i>CUMULUS</i> -OOPHORUS	15
3.3	COMPETÊNCIA OOCITÁRIA	18
3.4	MATURAÇÃO OOCITÁRIA	18
3.4.1	Maturação nuclear	19
3.4.2	Maturação citoplasmática	21
3.4.3	Eventos moleculares da maturação nuclear e citoplasmática	24
3.4.4	Modificações ultraestruturais do oócito	24
3.4.5	A zona pelúcida e suas modificações durante a maturação	26
3.5	A MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	29
3.5.1	Efeitos das gonadotrofinas hipofisárias e hormônios esteroides	30
3.5.2	Efeitos dos fatores de crescimento	32
3.5.3	O papel das células do <i>Cumulus</i> na maturação <i>in vitro</i>	33
3.5.4	Sistemas de maturação <i>in vitro</i> com co-cultivos celulares	33
3.5.4.1	<i>Co-cultivo com células da granulosa e do Cumulus-oophorus</i>	35
3.5.4.2	<i>Meios condicionados nos sistemas de maturação in vitro</i>	36
3.5.5	Oócitos desnudos na maturação <i>in vitro</i>	38
4.	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	MATERIAIS E REAGENTES	40
4.2	COLETA E MANIPULAÇÃO DOS OVÁRIOS	40
4.3	RECUPERAÇÃO DOS OÓCITOS	40
4.4	DESNUDAMENTO DOS OÓCITOS	40
4.5	PREPARO DO MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS DO <i>CUMULUS</i>	41
4.5.1	Cultivo em monocamada de células do <i>Cumulus</i>	41
4.5.2	Condicionamento do meio	41
4.6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	42
4.7	MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	43
4.7	FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i>	43

4.8	CULTIVO EMBRIONÁRIO <i>IN VITRO</i>	43
4.9	AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	44
4.10	PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	44
4.10.1	Maturação nuclear e citoplasmática	44
4.10.2	Tempo de digestão enzimática da zona pelúcida	45
4.10.3	Ultraestrutura oocitária por microscopia eletrônica de transmissão	46
4.10.4	Expansão das células do <i>Cumulus</i>	46
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5.	RESULTADOS	47
5.1	O MEIO CONDICIONADO	47
5.2	AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	48
5.2.1	Maturação nuclear	48
5.2.2	Maturação citoplasmática	49
5.2.3	Tempo de digestão enzimática da zona pelúcida	54
5.2.4	Ultraestrutura oocitária por microscopia eletrônica de transmissão	56
5.2.5	Expansão das células do <i>Cumulus</i>	58
5.3	DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	58
5.3.1	Taxa de clivagem	58
5.6.2	Taxa de blastocisto	58
6.	DISCUSSÃO	59
7.	CONCLUSÕES	65
8.	ANEXO: Certificado de Aprovação do Projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-UFMG	66
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Estágio de maturação nuclear de complexos Cumulus-oócito e oócitos desnudos bovinos maturados em meio controle e meio condicionado	48
Tabela 2.	Configuração da cromatina de complexos Cumulus-oócito e oócitos desnudos bovinos maturados em meio controle e meio condicionado	48
Tabela 3.	Maturação citoplasmática de CCOs e oócitos desnudos bovinos maturados em meio controle e meio condicionado	50
Tabela 4.	Maturação citoplasmática de oócitos bovinos maturados em meio controle e meio condicionado	50
Tabela 5.	Padrão de distribuição mitocondrial de complexos <i>Cumulus</i> oócito e oócitos desnudos bovinos com maturação citoplasmática, em meio controle e meio condicionado	50
Tabela 6.	Padrão de distribuição mitocondrial de complexos <i>Cumulus</i> oócito e oócitos desnudos bovinos com maturação citoplasmática, independente do meio de maturação.	51
Tabela 7.	Maturação nuclear e citoplasmática avaliada simultaneamente com Hoescht e Mitotracker em complexos <i>Cumulus</i> -oócito e oócitos desnudos bovinos maturados em meio controle e meio condicionado	51
Tabela 8.	Tempos de digestão enzimática em minutos da zona pelúcida de CCOs e oócitos desnudos bovinos à quimotripsina 1%	54
Tabela 9.	Tempos de digestão enzimática em minutos da zona pelúcida de CCOs e oócitos desnudos bovinos à pronase 0,5%	54
Tabela 10.	Taxas de expansão do <i>Cumulus</i> de CCOs maturados em meio controle e em meio condicionado	58
Tabela 11.	Taxa de clivagem e taxa de blastocisto para CCOs e oócitos desnudos bovinos maturados em meio controle e meio condicionado	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Comunicação oócito-células do <i>Cumulus</i>	16
Figura 2.	Regulação do diálogo entre o oócito e as células do <i>Cumulus</i> na retomada da meiose	20
Figura 3.	Imagens de força atômica (15 x 15 µm) de zona pelúcida bovina isolada de oócitos bovinos imaturos, maturados e fertilizados	26
Figura 4.	Microscopia eletrônica de varredura da superfície externa de zona pelúcida de oócitos e zigotos suínos	28
Figura 5.	Microscopia eletrônica de varredura da superfície externa de ZP de suíno	29
Figura 6.	Padrão de crescimento de células da granulosa humanas em sistema de cultura convencional ou quimicamente definido	35
Figura 7.	Células da granulosa de bovino durante contagem em câmara de Neubauer	41
Figura 8.	Foto e esquema do delineamento experimental, ilustrando os 4 tratamentos aplicados durante a maturação in vitro dos CCOs e oócitos desnudos bovinos	42
Figura 9.	Esquema da configuração da cromatina em oócitos em estágio de VG, MI e MII	45
Figura 10.	Cultivo de células do <i>Cumulus</i> em monocamada, com 80% de confluência	47
Figura 11.	Microscopia de fluorescência apresentando CCO em metáfase II (A), oócito desnudo em metáfase I (B) e CCO em VG (C)	49
Figura 12.	Imagens de microscopia confocal e de fluorescência de oócito desnudo maturado em meio controle- padrão de distribuição mitocondrial (Mitotracker Orange CMTM Ros) e configuração cromossômica (HOESCHT)	52
Figura 13.	Padrão de distribuição mitocondrial e configuração cromossômica. Imagens de microscopia confocal e de fluorescência de oócito desnudo maturado em meio condicionado	53
Figura 14.	Padrão de distribuição mitocondrial e configuração cromossômica. Imagens de microscopia confocal e de fluorescência de CCO maturado em meio controle	53
Figura 15.	Ensaio de digestão da zona pelúcida (ZP) em solução de pronase 0.5%.	55
Figura 16.	Ultraestrutura de CCO bovino maturado em meio controle	56
Figura 17.	Ultraestrutura de CCO bovino imaturo (controle negativo)	57
Figura 18.	Ultraestrutura de oócito desnudo maturado em meio condicionado	57

RESUMO

Um dos desafios da medicina e biologia reprodutiva é entender a natureza dos processos moleculares e celulares que controlam a competência oocitária para o desenvolvimento. Esta competência, adquirida por meio da maturação, processo complexo que compreende a maturação nuclear e citoplasmática, envolve uma interação profunda entre oócito e células do *Cumulus oophorus*. As células do *Cumulus oophorus* são chave para a sinalização parácrina e endócrina e para a maturação oocitária; no entanto, em muitas aplicações é necessária sua remoção, ou desnudamento dos oócitos, antes do início da maturação *in vitro*. Como o desnudamento reduz a competência de desenvolvimento, um sistema eficiente de maturação *in vitro* para oócitos desnudos é necessário, e até o presente nenhum sistema está bem estabelecido para mamíferos. Diferentes sistemas usam co-cultivos de células homólogas e heterólogas ou meios condicionados por células para tirar proveito de fatores por elas secretados e otimizar os resultados na produção *in vitro*. Avaliou-se o efeito de um meio condicionado por células do *Cumulus oophorus* de bovinos na maturação *in vitro* de oócitos bovinos desnudos e no seu potencial de desenvolvimento embrionário. O experimento foi realizado no Laboratório de Produção *in vitro* de Embriões da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. Os oócitos foram aspirados de folículos entre 2 e 8 mm de diâmetro, de ovários obtidos em abatedouro. Oócitos de graus I e II, metade dos quais desnudada por pipetagens sucessivas previamente à maturação, foram maturados em meio controle e no meio condicionado desenvolvido previamente a partir do cultivo de células do *Cumulus oophorus* de bovinos. Foram maturados 2927 oócitos (1525 complexos *Cumulus*-oócito (CCOs) e 1402 oócitos desnudados), dos quais 894 foram utilizados para avaliação da maturação e 2033 para avaliação do desenvolvimento embrionário. A avaliação da maturação oocitária *in vitro* foi feita com base na maturação nuclear, maturação citoplasmática (distribuição mitocondrial), tempo de digestão enzimática da zona pelúcida com quimotripsina 1% e pronase 0,5% e ultraestrutura por microscopia eletrônica de transmissão. Adicionalmente, foi feita a avaliação da expansão das células do *Cumulus* dos CCOs maturados. A avaliação do potencial de desenvolvimento embrionário foi feita com base nas taxas de clivagem e blastocisto dos embriões. Não houve diferenças significativas na maturação nuclear dos oócitos maturados em meio controle e em meio condicionado, bem como não houve diferenças entre a maturação nuclear de CCOs e oócitos desnudos. A maturação citoplasmática em meio condicionado não foi significativamente diferente da em meio controle. Oócitos desnudos apresentaram padrão de distribuição mitocondrial predominantemente heterogêneo-periférico, enquanto CCOs apresentaram padrão heterogêneo-perinuclear predominante. Oócitos desnudos maturados no meio condicionado apresentaram redução significativa do tempo de digestão da zona pelúcida em ensaio de digestão enzimática com quimotripsina 1%, porém houve inconsistências entre os resultados obtidos nos ensaios com as duas enzimas. Não houve diferenças significativas entre taxas de clivagem e blastocistos entre os oócitos maturados em meio controle e meio condicionado. Conclui-se que, nas condições experimentais, o meio condicionado obtido a partir de células do *Cumulus oophorus* de bovinos não se mostrou superior ao meio controle com relação à maturação oocitária *in vitro* dos oócitos bovinos desnudos e nem com relação ao seu desenvolvimento embrionário. Portanto, não se recomenda a sua incorporação às rotinas de produção *in vitro* de embriões. Continuam necessários estudos para melhor compreensão dos eventos relacionados à aquisição da competência oocitária e para que se desenvolvam meios de maturação mais eficientes para oócitos desnudos.

Palavras-Chave: *Cumulus oophorus*, meio condicionado, oócitos desnudos, maturação *in vitro*.

ABSTRACT

One of the challenges of reproductive biology and medicine is to understand the nature of the molecular and cellular processes that control oocyte developmental competence. This competence, acquired through maturation, a complex process that comprises nuclear and cytoplasmic maturation, involves a deep interaction between the oocyte and *Cumulus oophorus* cells. *Cumulus oophorus* cells are key for paracrine and endocrine signaling and for oocyte maturation; however, in many applications, removal of these cells, or oocyte denudation, is required before maturation begins or prior to *in vitro* fertilization. Because denudation reduces developmental competence, an efficient *in vitro* maturation system for denuded oocytes is needed, as no system has been well established in mammals. Different systems use co-cultures of homologous and heterologous cells or media conditioned by these cells, to take advantage of factors secreted by them and optimize results in *in vitro* production. The present study evaluates the effect of a medium conditioned by a culture of bovine *Cumulus-oophorus* cells in the *in vitro* maturation of bovine denuded oocytes and their embryonic development potential. The experiment was carried out in the Laboratory of *in vitro* Production of Embryos at the School of Veterinary Medicine, Federal University of Minas Gerais, Brazil. The oocytes were aspirated from follicles between 2 and 8 mm in diameter from slaughterhouse ovaries. Grade I and II oocytes, half of which had been denuded by successive pipetting prior to maturation, were matured in control medium and in the conditioned media previously obtained from the culture of *Cumulus oophorus* cells. 2927 oocytes were matured, of which 894 were used for evaluation of maturation and 2033 for evaluation of embryonic development. The evaluation of *in vitro* oocyte maturation was performed based on nuclear maturation, cytoplasmic maturation (mitochondrial distribution), enzymatic dissolution of zona pellucida with chymotrypsin 1% and pronase 0.5% and ultrastructure by transmission electron microscopy. The evaluation of embryonic development potential was based on embryo cleavage and blastocyst rates. There were no significant differences in nuclear maturation of oocytes in control medium and conditioned medium, as well as no differences between nuclear maturation of CCOs and denuded oocytes. Cytoplasmic maturation in conditioned medium was not significantly different from that in control medium. Denuded oocytes presented a predominantly heterogeneous-peripheral mitochondrial distribution pattern, whereas CCOs had a predominant heterogeneous-perinuclear pattern. Denuded oocytes matured in the conditioned medium showed a significant reduction of the dissolution time of the zona pellucida in enzymatic dissolution assay with chymotrypsin 1%, but there were inconsistencies between the results obtained in the assays with the two enzymes. There were no significant differences between cleavage and blastocysts rates between oocytes matured in control medium and conditioned medium. In conclusion, under these experimental conditions, the conditioned medium from bovine *Cumulus oophorus* cells did not prove to be superior to the control medium in relation to the *in vitro* oocyte maturation of the denuded oocytes nor with respect to its embryonic development and, therefore, its incorporation into *in vitro* embryo production routines is not recommended. Further studies are still needed to better understand the events related to the acquisition of oocyte competence and to develop more efficient *in vitro* maturation media for denuded oocytes.

Keywords: *Cumulus oophorus*, conditioned medium, denuded oocytes, *in vitro* maturation.

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões avançou imensamente ao longo das últimas décadas. No entanto, embriões produzidos *in vitro* ainda diferem dos seus homólogos produzidos *in vivo*. No caso de bovinos, é possível atingir taxas de blastocistos de até 70% se os oócitos forem maturados *in vivo*; no entanto, se maturados *in vitro* as taxas de blastocistos são apenas a metade. Esta limitação está relacionada à população heterogênea de oócitos que normalmente é recuperada de folículos de 3 a 8 mm; diferentemente dos oócitos ovulados *in vivo*, estes oócitos ainda não adquiriram a competência de desenvolvimento até o estágio pré-ovulatório (Wrenzycki e Stinshoff, 2013).

A competência, ou qualidade de desenvolvimento do oócito é definida como a capacidade do oócito maturar, ser fertilizado e dar origem a descendentes normais (Sirard, M. *et al.*, 2006). Um dos principais desafios da medicina e biologia reprodutiva é entender os processos moleculares e celulares que controlam a competência oocitária. Esta competência é adquirida por meio da maturação, processo complexo que envolve maturação nuclear, citoplasmática e um sincronismo perfeito entre elas (Gilchrist, R. *et al.*, 2008).

O microambiente folicular do ovário e os sinais maternos, mediados principalmente pelas células da granulosa e do *Cumulus*, são responsáveis por apoiar o crescimento do oócito, seu desenvolvimento e a aquisição gradual de competências para o desenvolvimento (Sutton, M. L. e Cetica *et al.*, 2003). A comunicação bidirecional entre oócitos e células do *Cumulus* no folículo é complexa, ocorrendo por meio de vários caminhos coordenados e eventos de sinalização, que envolvem *gap junctions* e sinais parácrinos. Esse alto nível de complexidade faz com que seja difícil identificar as características críticas de um oócito necessárias para alcançar a competência para fertilização e desenvolvimento embrionário (Zuccotti *et al.*, 2011).

As células do *Cumulus* são importantes para a maturação nuclear e citoplasmática do oócito, o endurecimento da zona pelúcida, o padrão de fertilização e a qualidade e eficiência de desenvolvimento do embrião (Combelles *et al.*, 2002). No entanto, o desnudamento de oócitos antes do início da maturação ou antes da fertilização *in vitro* (FIV) é necessário para uma variedade de aplicações, que incluem criopreservação de oócitos em estágio de vesícula germinativa (Modina *et al.*, 2004), transferência de vesículas germinativas (Liu *et al.*, 2000), haploidização de células somáticas, transferência pronuclear (Xiong *et al.*, 2008), entre outras. Além disso, aspectos técnicos da recuperação oocitária, como maior fluxo e pressão de aspiração, ou menor diâmetro de agulha, podem resultar no desnudamento total ou parcial do oócito (Bols *et al.*, 1997).

O desnudamento tem efeito significativamente prejudicial na aquisição de competência oocitária, na maturação e na fertilização. Como o desnudamento reduz a competência de desenvolvimento, um sistema mais eficiente de maturação *in vitro* para oócitos desnudos (ODs) é urgentemente necessário. Nenhum sistema foi até agora bem estabelecido em mamíferos (Ge, L. e Han e *et al.*, 2008).

Diferentes sistemas de maturação *in vitro* trabalham com co-cultivos de células homólogas e heterólogas (Goovaerts *et al.*, 2011) baseando-se em fatores por elas secretados para tentar melhorar a maturação de oócitos desnudos e também de complexos *Cumulus*-oócito. A monocamada de células da granulosa é um dos sistemas de co-cultivo mais utilizados, porém os

mecanismos pelos quais estas células suportam a maturação dos oócitos são apenas parcialmente entendidos (Malekshah *et al.*, 2006).

Apesar dos efeitos positivos dos co-cultivos celulares, alguns laboratórios preferem utilizar meios condicionados, por razões sanitárias e por praticidade (Malekshah *et al.*, 2006). Meio condicionado é um meio sem células, porém já parcialmente utilizado por células e portanto enriquecido com produtos da secreção celular, como fatores de crescimento e fatores embriotróficos (Dirnfeld *et al.*, 1997). Alguns estudos mostram que os meios condicionados são tão eficazes quanto suas próprias células em co-cultivo (Kobayashi *et al.*, 1992; Mermillod *et al.*, 1993; Hernandez-Ledezma *et al.*, 1995; Lee, Y.L. *et al.*, 2003); já outros relatam uma reprodução apenas parcial dos efeitos das células (Maeda *et al.*, 1996; Stojkovic *et al.*, 1997).

Neste contexto, objetivou-se desenvolver um meio condicionado por células do *Cumulus oophorus* de bovinos e avaliar seu efeito na maturação e no potencial de desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos desnudos. Os resultados podem contribuir para desenvolver novos protocolos para a maturação *in vitro* de oócitos desnudos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e determinar o efeito de um meio condicionado por células do *Cumulus oophorus* de bovinos na maturação e no potencial de desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos desnudos.

2.2 Objetivos específicos

Determinar o efeito de um meio condicionado por células de *Cumulus oophorus* de bovinos na maturação e no potencial de desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos desnudos com base nos seguintes parâmetros:

1. Taxa de maturação nuclear
2. Taxa de maturação citoplasmática baseada no padrão de distribuição mitocondrial
3. Tempo de digestão enzimática da zona pelúcida
4. Ultraestrutura oocitária
5. Taxa de expansão das células do *cumulus*
6. Taxa de clivagem
7. Taxa de blastocisto

3. REVISÃO DE LITERATURA

O principal desafio para as biotecnias de reprodução assistida é entender a natureza dos processos celulares e moleculares que controlam a aquisição da competência oocitária para o desenvolvimento (Gilchrist, R. *et al.*, 2008). A qualidade do oócito é fundamental para a fertilidade, porém os conhecimentos ainda são limitados sobre o que é qualidade do oócito e quais mecanismos a regulam. A competência para o desenvolvimento pode ser definida como a habilidade do oócito finalizar a maturação, ser fertilizado, chegar ao estágio de blastocisto e gerar progênie viável. Conseguir completar cada uma destas etapas de maneira bem sucedida requer um efeito ideal e bem orquestrado de moléculas e vias moleculares em tempo, espaço e magnitude específicos (Blondin *et al.*, 2012). Este alto nível de complexidade, relacionado ao micro ambiente folicular e aos sinais maternos, mediado principalmente pelas células da granulosa e do *Cumulus*, torna difícil caracterizar quais são os fatores críticos para que um oócito adquira competência para a fertilização e p desenvolvimento embrionário (Zuccotti *et al.*, 2011).

3.1. FOLICULOGÊNESE

Oócitos adquirem competência para o desenvolvimento no folículo ovariano, que, em mamíferos euterianos, consiste de camadas de células da teca e células da granulosa circundando o oócito. O crescimento e o desenvolvimento dos compartimentos somático e gamético do folículo ovariano ocorrem de maneira altamente coordenada e mutuamente dependente (Gilchrist, R. B. *et al.*, 2004).

O processo da foliculogênese pode ser dividido em três fases principais: (i) a transição de folículo primordial para folículo primário; (ii) o crescimento folicular; (iii) o desenvolvimento antral até a ovulação.

(i) De folículo primordial a folículo primário:

As oogônias de mamíferos entram em meiose durante a vida fetal e seu desenvolvimento é interrompido no estágio de diplóteno da prófase da primeira divisão meiótica. Permanecem neste estágio até a puberdade, quando a onda de hormônio luteinizante (LH) leva à retomada da meiose e à ovulação de oócitos em estágio de meiose II (Zuccotti *et al.*, 2011).

No início da primeira divisão meiótica os oócitos têm um diâmetro de 10 a 20 μm e estão circundados por uma única camada de células pré-granulosas pavimentosas apoiadas em uma membrana basal. Estes ninhos de células germinativas são os folículos primordiais. Nesta fase, as células da granulosa não são ativas endocrinologicamente nem apresentam receptores para gonadotrofinas, especialmente para o hormônio folículo estimulante (FSH), o que só ocorre quando o folículo entra em fase de crescimento. Os folículos permanecem em estágio primordial até seu recrutamento (Zuccotti *et al.*, 2011). Há uma série de fatores, muitos ainda desconhecidos, que levam à parada ou à indução do recrutamento dos folículos primordiais: fatores inibidores, como o hormônio anti-mulleriano, e uma longa lista de fatores ativadores, incluindo os secretados pelas células da granulosa (Durlinger *et al.*, 2002).

(ii) Transição de folículo primário para secundário:

Quando um folículo primordial é recrutado, as células da granulosa se tornam cuboides, o oócito aumenta de tamanho começa a ser feita a deposição da zona pelúcida, e as células estromais se

organizam em camadas de células da teca externas à membrana basal. O fator 9 de diferenciação e crescimento (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea 15 (BMP-15), proteínas derivadas dos oócitos, atuam de maneira equilibrada regulando a proliferação das células foliculares (Edwards *et al.*, 2008). Estruturas importantes que aparecem neste estágio do desenvolvimento e que regulam a interação entre os oócitos e as células foliculares adjacentes, principalmente aquelas na camada mais próxima à zona pelúcida, são as projeções transzonais, que mantêm uma ligação física entre o oócitos e o compartimento somático do folículo. Esta relação oócitos/células foliculares via projeções transzonais é regulada pelo FSH e é fundamental para o crescimento de um oócito competente (Eppig, J. J., 2001).

(iii) Desenvolvimento antral até a ovulação

A transição do estágio pré-antral para o estágio antral é controlada pelo FSH e por fatores secretados pelos oócitos. O estágio antral é caracterizado pelo aparecimento de uma cavidade preenchida por líquido, o antro, que começa a se formar quando o folículo chega a um tamanho que varia de 180 a 300 µm, dependendo da espécie, e a um número crítico de células da granulosa.

À medida que o antro é formado, as células da granulosa se separam em dois tipos celulares anatômica e funcionalmente diferentes: as células do *Cumulus oophorus* (*Cumulus*, neste texto), que circundam e estão em íntimo contato metabólico com o oócito, e as células murais da granulosa, que revestem a parede folicular, formando um epitélio estratificado com a lâmina basal, com função principalmente esteroideogênica (Gilchrist, R. B. *et al.*, 2004).

Embora a formação do antro não seja fundamental para a aquisição de um potencial de desenvolvimento pleno, o fluido folicular representa um microambiente enriquecido por moléculas nutricionais e regulatórias, bem como por fatores apoptóticos. Altas concentrações de estradiol e baixas concentrações de proteínas ligantes ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP-2, -4 e -5) são típicas de folículos dominantes e pré-ovulatórios (Fortune *et al.*, 2004).

A fase antral do desenvolvimento folicular caracteriza-se pela dependência das gonadotrofinas, FSH e LH, ciclicamente secretadas pela hipófise. O FSH se liga a seus receptores e ativa a via AMPc/ proteína quinase A, promovendo proliferação celular, diferenciação das células foliculares em células do *Cumulus* e murais da granulosa e aquisição da competência meiótica (Richards, 2001).

A fase final da foliculogênese, que leva à retomada da meiose e à quebra da vesícula germinativa, é desencadeada pelo pico de LH e resulta do fim da ação inibitória exercida pelas células foliculares que circundam o oócito e da interrupção da ação do AMPc e outras moléculas inibitórias no oócito (Mehlmann, 2005).

3.2 O CUMULUS OOPHORUS

O crescimento e desenvolvimento do oócito são dependentes da capacidade de suporte do folículo, mais especificamente das células da granulosa. Há um importante eixo de comunicação bidirecional entre o oócito e as células da granulosa, com um grande número de moléculas, proteínas e processos celulares envolvidos. As células do *Cumulus*, altamente especializadas, apresentam projeções citoplasmáticas transzonais que penetram na zona pelúcida e chegam ao

oolema, formando o complexo *Cumulus*-oócito (CCO). Junções intercelulares (*gap junctions*) ao final destas projeções e entre as células do *Cumulus* possibilitam a transferência de nutrientes e fatores essenciais para o desenvolvimento, como metabólitos, aminoácidos e outras moléculas regulatórias de baixo peso molecular, enquanto moléculas maiores são transportadas por endocitose mediada por receptores (Fig. 1) (Gilchrist, R. B. *et al.*, 2004). Os contatos celulares entre o oócito e as células foliculares não devem ser considerados como estruturas permanentes, e sim como “dispositivos” específicos em constante adaptação morfológica em resposta à atividade tanto do oócitos como das células do *Cumulus* (Gilchrist, R. *et al.*, 2008).

Como a comunicação intercelular mediada por *gap-junctions* é requerida não apenas para que o oócito complete seu crescimento, mas também para que adquira competência meiótica nuclear e citoplasmática, é de grande interesse entender como a ruptura desta comunicação bidirecional durante a maturação *in vitro* impacta no desenvolvimento embrionário e fetal subsequente (Khurana e Niemann, 2000).

Uma segunda forma de comunicação entre o oócito e as células da granulosa é a sinalização parácrina. O oócito, regulador fundamental da foliculogênese, secreta fatores parácrinos solúveis (OSFs) que são transmitidos às células do *Cumulus* para regular importantes processos celulares destas células, incluindo proliferação, apoptose, diferenciação, luteinização, metabolismo e expansão (Gilchrist, R. B. *et al.*, 2004). Estudos mostram que a adição de OSFs nativos endógenos durante a maturação *in vitro* melhora significativamente o desenvolvimento embrionário de bovinos (Sudiman *et al.*, 2014).

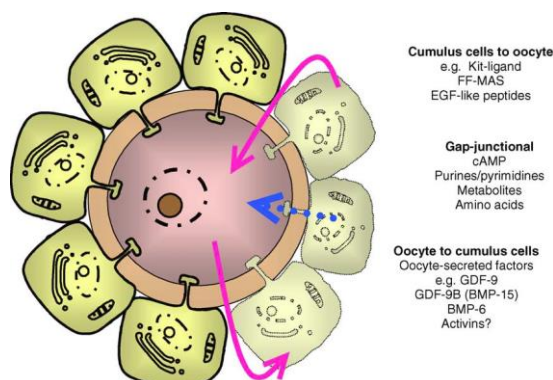


Figura 1. Comunicação oócito-células do *Cumulus* (modificado de SUTTON *et al.* (2003), com permissão da Oxford University Press). Essencial para o crescimento e desenvolvimento normais do oócito e do folículo, esta comunicação ocorre via sinais parácrinos (setas curvas) e troca de moléculas regulatórias por meio de *gap-junctions* (seta reta), em um eixo de comunicação bidirecional.

Esta dupla via de comunicação desempenha papel chave na sinalização local e endócrina (Sutton, M. L. e Cetica *et al.*, 2003). Simon *et al.* (1997) demonstraram que a comunicação oócito-células somáticas é essencial para o desenvolvimento, visto que a deleção do gene da subunidade *gap*-juncional oócito-específica, conexina-37, leva à esterilidade em fêmeas de camundongos.

As células do *Cumulus* desempenham papel importante na regulação da maturação citoplasmática e nuclear; por exemplo, a transmissão de moléculas regulatórias como AMPc e purinas/pirimidinas via *gap-junctions* possibilita manter a meiose estacionada no oócito (Eppig,

J. J.; Downs, 1984). Após a onda de LH, fatores solúveis secretados pelos oócitos ativam a produção de um sinal indutor de meiose pelas células do *Cumulus*, e o sinal é transferido de volta aos oócitos pelas *gap-junctions* (Su *et al.*, 2009). Torner *et al.* (2004) relatam que a maioria dos oócitos com *Cumulus* compacto se encontra em estágio de vesícula germinativa e a maioria dos oócitos com *Cumulus* expandido está em telófase I ou metáfase II, indicando que a expansão do *Cumulus* está associada à maturação nuclear, e de fato precede a maturação nuclear.

O perfil metabólico de oócitos desprovidos de células do *Cumulus* difere significativamente dos complexos *Cumulus*-oócito. A glicose é metabolizada em piruvato pelas células do *Cumulus* e subsequentemente transferida para os oócitos e utilizada nos processos de produção de energia. Os oócitos não metabolizam bem a glicose e são dependentes das células do *Cumulus* para obtenção de piruvato e outros produtos glicolíticos, e também para aminoácidos, essenciais para seu crescimento e desenvolvimento (Su *et al.*, 2009). Parte do colesterol sintetizado pelas células do *Cumulus* também é transferido para os oócitos, visto que o oócito é incapaz de produzir e captar este lipídeo a partir do ambiente externo (Su *et al.*, 2009).

Sabe-se que a adição de FSH e fator de crescimento epidermal (EGF) ao meio de maturação tem efeitos positivos na maturação nuclear, na fertilização e nas taxas de gestação. Estes efeitos são mediados pelas células do *Cumulus*. Supõe-se que a sinalização por FSH e EGF contribua para a aquisição de competência por meio da comunicação via *gap-junction*, que media a troca de fatores necessários para a competência oocitária ótima e para o desenvolvimento fetal subsequente (Yeo *et al.*, 2009).

À medida que o oócito amadurece em resposta à onda pré-ovulatória de gonadotrofinas, as células do *Cumulus* secretam ácido hialurônico, um glicosaminoglicano não sulfatado que se liga às células do *Cumulus* por proteínas de ligação. Quando o ácido hialurônico se torna hidratado, os espaços entre as células do *Cumulus* ficam aumentados e as células ficam embebidas em uma matriz pegajosa, mucificada; este processo é denominado expansão ou mucificação do *Cumulus*. A expansão do *Cumulus* também depende de fatores de capacitação da expansão do *Cumulus* (CEEFs) produzidos pelo oócito (Dragovic *et al.*, 2005). Células do *Cumulus* isoladas são incapazes de responder ao FSH e formar uma matriz expandida. Os genes que codificam proteínas essenciais para este processo são estimulados pela presença concomitante de gonadotrofinas e oócitos ou fatores derivados dos oócitos. (Su *et al.*, 2009). Sugiura *et al.* (2010) demonstraram que, em camundongos, a GDF-9 e a BMP-15, junto com 17-beta-estradiol, coordenam o desenvolvimento e a expansão das células do *Cumulus*. Em grandes mamíferos, por outro lado, a expansão do *Cumulus* é mais regulada por fatores produzidos por células somáticas que por oócitos, como demonstrado em ovinos por (Cecconi *et al.*, 2008).

A expansão do *Cumulus* influencia o mecanismo de ovulação e impede que o oócito permaneça dentro do folículo, facilita a liberação do oócito na cavidade abdominal, a captura do oócito pelas fimbrias da tuba, melhora o grau de fertilização do oócito e, no caso da produção *in vitro*, aumenta a duração do período passível de fertilização dos oócitos maturados (Chen *et al.*, 1993). Segundo Gutnisky *et al.* (2007) a expansão do *Cumulus* contribui para a penetração e fertilização dos oócitos bovinos por meio da atração e seleção de espermatozoides e facilita a capacitação, a reação acrossômica e a penetração, além de prevenir o endurecimento precoce da zona pelúcida (Tanghe *et al.*, 2002). Se a expansão do *Cumulus* é suprimida, a taxa de ovulação é muito reduzida; a expansão do *Cumulus* é um dos vários processos que devem ocorrer em folículos pré-ovulatórios para permitir a ovulação (Chen *et al.*, 1993).

É ainda limitado o entendimento da natureza e diversidade das substâncias transferidas entre o oócito e as células do *Cumulus* durante o desenvolvimento antral, e como as alterações dinâmicas da comunicação *gap*-juncional ou a extensão das transferências moleculares impactam a aquisição da competência de desenvolvimento (Thomas *et al.*, 2004). O entendimento de fatores nutricionais, metabólicos ou hormonais que conferem competência ao oócito deve considerar o complexo *Cumulus*-oócito como um todo, e não os oócitos isoladamente.

3.3 COMPETÊNCIA OOCITÁRIA:

Antes da formação do antro, os oócitos são incapazes de progredir além do estágio de diplóteno da meiose I. Estes oócitos são considerados meioticamente incompetentes, um estado que é atribuído a uma insuficiência de moléculas regulatórias necessárias para guiar a progressão da meiose. No entanto, a maioria dos oócitos nos folículos antrais é meioticamente competente e reinicia a meiose espontaneamente se for removida do folículo e cultivada em meio adequado. Esta observação levou Pincus e Enzmann (1935) a concluir que as células somáticas foliculares bloqueiam a progressão da meiose em oócitos competentes.

Oócitos continuam a crescer depois que adquirem a competência para retomar a meiose. Contudo, oócitos competentes para retomar a meiose não são necessariamente competentes para passar por uma maturação nuclear completa e progredir para metáfase II. Oócitos isolados de pequenos folículos antrais são competentes para passar pela quebra da vesícula germinativa e progredir até a metáfase I, mas a progressão da meiose nestes oócitos geralmente é bloqueada neste estágio. Portanto, é necessário um tempo de desenvolvimento dos oócitos nos folículos antrais para que se tornem competentes para avançar até a metáfase II (Handel e Eppig, 1997)

Na maioria dos bovinos, o folículo ovariano interage com o oócito durante todos os passos da foliculogênese, mas em grandes espécies mono-ovulatórias, como os bovinos, a competência oocitária plena para se transformar em embrião viável é adquirida no folículo nos últimos dias antes da ovulação. Embora oócitos obtidos a partir de folículos não-dominantes possam produzir blastocistos *in vitro*, estes são menos competentes que aqueles de folículos dominantes ou pré-ovulatórios. Portanto, os últimos dias de foliculogênese são cruciais para o amadurecimento final do oócito antes da ovulação, resultando em preparação ótima dos gametas para os eventos de fertilização e pós-fertilização. Em um ciclo natural, este período é caracterizado por uma baixa quantidade de FSH e LH circulantes. Este baixo LH ou LH basal é, no entanto, suficiente para manter o crescimento folicular e a diferenciação que levam às condições que desencadeiam o pico de LH e a ovulação (Sirard, M., 2016).

A onda pré-ovulatória de gonadotrofinas leva a mudanças marcantes tanto no folículo como no complexo *Cumulus*-oócito. Os oócitos retomam a meiose e progridem à metáfase II antes da ovulação na maioria dos mamíferos. Os eventos nucleares e citoplasmáticos que ocorrem durante este processo são chamados de maturação oocitária, e são pré-requisitos para a formação de um oócito competente (Sirard, M., 2016).

3.4 MATURAÇÃO OOCITÁRIA

Para superar o desafio da competência oocitária é importante entender os fatores associados aos tipos de processos de maturação oocitária observados: meiótica ou nuclear e citoplasmática (Sirard, M. *et al.*, 2006).

3.4.1 Maturação nuclear:

O objetivo final da maturação nuclear é a divisão reducional dos cromossomos e a produção de um gameta haploide (n cromossomos), por meio de dois ciclos de divisão celular sem nova síntese de DNA. A primeira divisão separa os cromossomos homólogos e a segunda divisão separa as cromátides irmãs, formando os gametas haploides. É a progressão do núcleo do oócito do estágio de Prófase I (PI) até o de metáfase II (MII) da meiose, estágio maduro (Zuccotti *et al.*, 2011).

Experimentalmente, esta progressão pode ser determinada pela visualização da configuração cromossômica por meio de corantes fluorescentes (Combelles *et al.*, 2002)

Os oócitos iniciam o processo de maturação oocitária ainda na vida embrionária, mas este só irá ser concluído com a fertilização do gameta. As oogônias de mamíferos entram em meiose durante a vida fetal e seu desenvolvimento é interrompido no estágio de diplóteno da prófase da primeira divisão meiótica, também conhecido como vesícula germinativa, até que os oócitos completem seu desenvolvimento (Zuccotti *et al.*, 2011).

Os oócitos adquirem inicialmente capacidade para quebra da vesícula germinativa e condensação cromossômica; em seguida, no desenvolvimento folicular, a capacidade para progredir até metáfase I (MI), e por fim adquirem habilidade para chegar à metáfase II (MII) e serem fertilizados (Sánchez e Smits, 2012).

Oócitos bovinos adquirem capacidade de retomar a meiose em folículos antrais de 2-3 mm, e a competência para retomá-la e concluí-la é adquirida quando o oócito tem um diâmetro de aproximadamente 110 μm (Fair, T. *et al.*, 1995). A competência meiótica é adquirida precocemente, mas neste período os oócitos ainda não tem competência para o desenvolvimento e, portanto, têm que ser mantidos em estágio de vesícula germinativa até completarem sua maturação plena. A aquisição da competência meiótica ocorre quando o oócito adquire um nível limiar de proteínas promotoras da maturação, como CDK1 (quinase ciclina-dependente) e ciclina (Su *et al.*, 2004).

O bloqueio meiótico é regulado pelos níveis de AMP cíclico (AMPC) produzido pela adenilciclase (Su *et al.*, 2004); este AMPC é oriundo das células do *Cumulus*, que o passam para o oócitos por meio das junções *gap*, e /ou da própria produção endógena pelo oócito. A teoria mais aceita é a da produção e transferência de AMPC pelas células do *Cumulus*; embora haja produção de AMPC pelo próprio oócito, esta seria em quantidade insuficiente para manter o bloqueio meiótico. O fluxo de GMP cíclico (GMPc) das células do *Cumulus* para o oócitos via junções *gap* previne a ativação da AMPC-fosfodiesterase, enzima que degrada o AMPC, e desta forma mantém os níveis de AMPC altos, o que impede a retomada da meiose (Sela-Abramovich *et al.*, 2006).

A retomada da meiose, estimulada pela onda de LH, é iniciada por uma queda drástica nos níveis de AMPC. Após a sinalização do LH, os níveis de mRNA que codificam o peptídeo natriurético C (PNC) diminuem, levando a uma produção e difusão limitada de GMPc no/para o oócito, o que ativa a fosfodiesterase 3A (PD3A) nos oócitos a degradar ativamente o AMPC (Fig.2) (Sela-Abramovich *et al.*, 2006).

O declínio do AMPC provoca desfosforilação e ativação do fator promotor da maturação/meiose (MPF), um complexo proteico composto por ciclina B1 e P32cdc2; o MPF ativo fosforila as proteínas do envoltório nuclear e aquelas envolvidas com a condensação da cromatina (histonas)

e reorganização do citoesqueleto; a maquinaria celular é ativada e o oócito sofre a primeira metáfase e a extrusão do primeiro corpo polar até parar em metáfase II, sob a influência do fator citostático (CSF), um produto do oncogene *mos* expresso no início da maturação e que desaparece após a fertilização. O CSF estabiliza, direta ou indiretamente, a atividade do MPF durante a MII (Sirard, M. *et al.*, 2006).

Os receptores de LH estão localizados nas células murais da granulosa, e não nas células do *Cumulus* e nos oócitos; portanto, os mecanismos de estímulo da maturação oocitária pelo LH são indiretos (Eppig, J J *et al.*, 1997). A retomada da meiose ocorre em resposta à onda pré-ovulatória de LH, mas também pode ser induzida ao se retirar o oócito do folículo para cultivá-lo *in vitro* (Pincus e Enzmann, 1935).

Como a diminuição das junções *gap* está associada à queda das concentrações intraoocitárias de AMPc e resulta na retomada da meiose, este pode ser outro mecanismo empregado fisiologicamente pelo LH para estimular a maturação oocitária. Esta diminuição das junções *gap* está cronologicamente relacionada à maturação do oócito, mas outros fatores são necessários para controlar o bloqueio da meiose (Sela-Abramovich *et al.*, 2006). Em bovinos, há uma perda intensa das junções *gap* durante a retomada da meiose, mas algumas ligações remanescentes permanecem funcionais até a MII (Sutovsky *et al.*, 1993).

Os oócitos, por meio do diálogo com as células do *Cumulus*, contribuem para seu próprio bloqueio meiótico; eles promovem a produção de GMPc pelas células do *Cumulus* (Norris *et al.*, 2009). Recentemente, experimentos *in vitro* revelaram um papel direto de vários fatores secretados pelo oócitos, entre os quais GDF-9, BMP-15 e um fator denominado Fator de Crescimento Fibroblástico 8B (FGF8B); o estradiol também atua na regulação da produção de GMPc pelas células do *Cumulus* (Zhang, M. *et al.*, 2011).

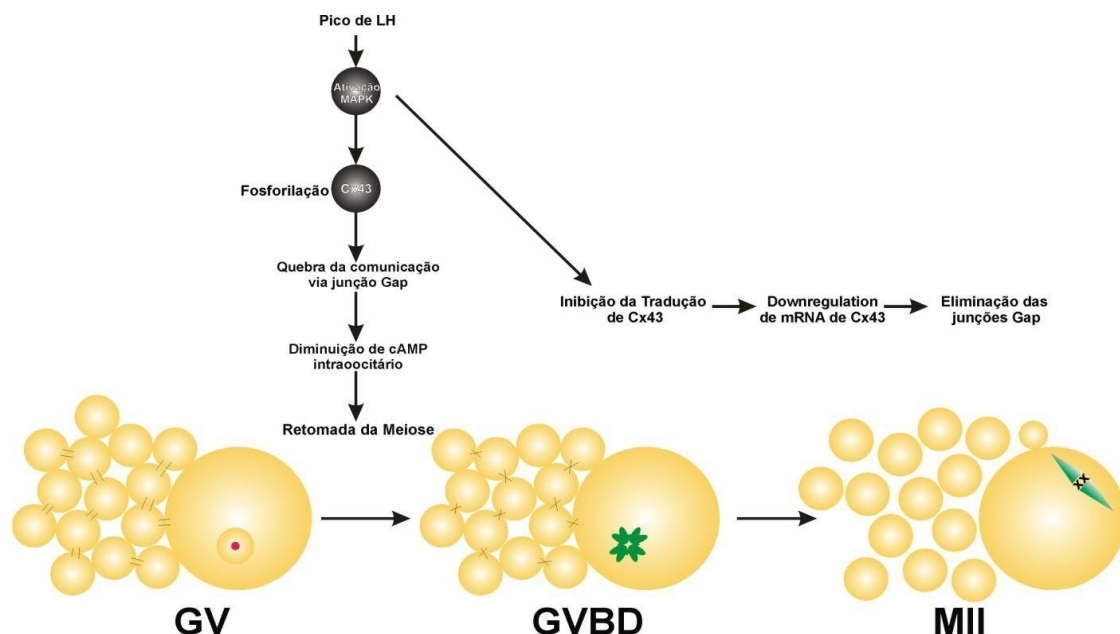


Figura 2. Regulação do diálogo entre o oócito e as células do *Cumulus* na retomada da meiose. Modificado de Sela-Abramovich *et al.* (2006). A fosforilação da conexina 43 (Cx43) pela MAPK diminui a concentração intraoocitária de AMPc, levando à retomada da meiose. A inibição da tradução de Cx43 e a regulação negativa de seu mRNA são uma resposta tardia ao pico de LH. Esta resposta, também mediada pela MAPK, leva à eliminação das junções *Gap*.

As alterações nucleares nesta fase incluem condensação dos cromossomos, desaparecimento do nucléolo, degradação da membrana celular e rompimento da membrana nuclear, caracterizando a quebra da vesícula germinativa (GVBD). Em seguida, o oócito passa pelos estádios de diacinese, metáfase I (MI), anáfase I (AI) e telófase (TI) e completa a primeira divisão meiótica; ocorre uma divisão assimétrica do citoplasma, originando uma célula menor, o corpúsculo polar, e outra maior, o oócito secundário. Os cromossomos homólogos se separam em dois grupos; a metade do número original de cromossomos permanece alinhados no centro do fuso presente no oócito (célula haploide) e a outra metade é incorporada ao corpúsculo polar (Donahue, 1968). Estes eventos caracterizam a metáfase II e a partir daí a meiose é interrompida, no que é conhecido como segundo bloqueio meiótico. O reinício da meiose poderá ocorrer em decorrência da fecundação do espermatozoide ou por ativação partenogenética (Sirard, M. A., 2001)

O tempo de maturação nuclear é preciso e definido. Sirard, M. A. *et al.* (1989) descreveram um período de 24 horas para o oócito bovino completar sua maturação nuclear após a onda de LH: presença da vesícula germinativa de 0 a 6.6 horas, quebra da vesícula germinativa de 6.6 a 8 h, condensação da cromatina de 8 a 10.3h, metáfase I de 10.3 a 15.4h, anáfase de 16.4 a 16.6h, telófase de 16.6 a 18h e metáfase II de 18 a 24h.

Evidências crescentes demonstram que a qualidade e competência do oócito dependem de eventos que ocorrem antes da retomada da meiose, sugerindo que o oócito acumula informações apropriadas para se tornar competente antes que ocorra a condensação cromossômica. A compreensão dos mecanismos envolvidos na manutenção do bloqueio meiótico é de particular importância para o desenvolvimento de técnicas de maturação *in vitro* (MIV) para melhorar a competência de desenvolvimento (Sirard, M. *et al.*, 2006).

3.4.2 Maturação citoplasmática

A maturação citoplasmática não é tão bem definida como o processo meiótico porque compreende tanto eventos visíveis como invisíveis ao microscópio. A descrição precoce da maturação citoplasmática baseia-se em observações ultraestruturais durante os poucos dias antes do aumento do LH, quando os oócitos esperam o sinal da ovulação. A primeira evidência de competência citoplasmática ocorre quando o oócito interrompe sua fase de preparação (RNA e síntese proteica), modificando a maquinaria de tradução e transcrição (condensação de nucléolos e depleção de ribossomos). A segunda série de mudanças ocorre perto da onda de LH, que leva a uma redistribuição de organelas, como mitocôndrias e grânulos corticais, juntamente com as alterações que ocorrem com a retomada da meiose. A maturação dos oócitos inclui a interrupção das junções *gap* entre as projeções das células do *Cumulus* e os oócitos e a quebra do envelope nuclear nas primeiras 12 h após o pico de LH; em aproximadamente 15 h, a metáfase da primeira divisão meiótica ocorre e os rearranjos espaciais das mitocôndrias e vesículas são vistos no ooplasma. Em aproximadamente 19 h o primeiro corpo polar é extruído e o oócito entra em metáfase II; às 21-22 h, os grânulos corticais migram para posições solitárias ao longo do oolema, o complexo de Golgi se reduz e o retículo endoplasmático liso transforma-se (Hyttel e Greve *et al.*, 1989).

A capacidade dos oócitos para completar o desenvolvimento pré-implantação não parece estar fortemente ligada à sua capacidade de finalizar a maturação nuclear, mas a retomada da meiose é essencial para a ativação de alguns aspectos críticos da maturação citoplasmática, particularmente aqueles relacionados à fertilização (Eppig, JJ, 1996). No entanto, tem sido claramente

documentado (Bavister e Squirrell, 2000; Tarazona *et al.*, 2006) que, na maturação nuclear e citoplasmática, bem como na fertilização e desenvolvimento inicial dos embriões, as mitocôndrias desempenham um papel importante. O tamanho numérico mitocondrial normal em oócitos maduros é um fator crítico na determinação do desenvolvimento de oócitos e embriões.

Nos oócitos bovinos, o principal momento de realocação das mitocôndrias é durante a maturação *in vitro* (IVM) e este processo é influenciado por hormônios e substratos energéticos no meio de maturação. Embora existam outras vias metabólicas para a produção de energia, o ATP resultante da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias é essencial para a sobrevivência, mas o papel das mitocôndrias ou o mecanismo que rege a atividade mitocondrial ainda não está claro (Stojkovic, 2001).

Em camundongos, Van Blerkom (2008) relatou, pela primeira vez, com sondas fluorescentes específicas e microscopia de laser confocal, alterações de distribuição das mitocôndrias, que passam de uma forma homogênea (pequenos grânulos difundidos em todo o citoplasma) a uma forma heterogênea (pericorticais/ perinucleares) durante a maturação meiótica. Desde então, a distribuição e atividade mitocondrial já foram analisadas em oócitos de várias espécies, incluindo suínos (Sun, Q. *et al.*, 2001), bovinos (Stojkovic, 2001; Tarazona *et al.*, 2006) e humanos (Wilding *et al.*, 2001).

Geralmente, a morfologia mitocondrial se desenvolve de um padrão difuso para um padrão granulado e oócitos maturados apresentam padrões agrupados (clusters) (Ambruosi *et al.*, 2009). A alta atividade mitocondrial e a realocação das mitocôndrias ao longo do ooplasma são mais frequentes para oócitos com boa morfologia e maior competência de desenvolvimento do que para oócitos com morfologia desfavorável e menor potencial de desenvolvimento (Stojkovic, 2001). Por esta razão a atividade, a morfologia e a distribuição das mitocôndrias podem ser utilizadas como critérios para a avaliação da qualidade e da competência de desenvolvimento de oócitos de mamíferos (Wang *et al.*, 2009).

A definição da distribuição das mitocôndrias dentro do ooplasma ao longo do processo de maturação é controversa. Segundo Tarazona *et al.* (2006), em oócitos imaturos a atividade mitocondrial é baixa e a distribuição é difusa, enquanto em oócitos maturados a atividade é alta e a distribuição é heterogênea ou pericitoplasmática. Ambruosi *et al.* (2009) relatam que o padrão de distribuição homogênea de grânulos mitocondriais pequenos no ooplasma indica imaturidade citoplasmática do oócito, enquanto a distribuição heterogênea de grânulos denotando grande atividade mitocondrial (alto nível de fluorescência) indica ooplasma ativo metabolicamente, e o acúmulo de mitocôndrias ativadas (fluorescência alta) na periferia do citoplasma e ou em torno do núcleo definem a maturação citoplasmática completa.

Stojkovic (2001), para oócitos bovinos e suínos, descreve um acúmulo de mitocôndrias na periferia do ooplasma antes da maturação, porém não organizadas em clusters, e a formação de clusters mitocondriais maiores localizados em direção ao centro do ooplasma após a maturação; no entanto, diz que esta movimentação em direção a regiões mais internas do citoplasma é observada apenas em oócitos de maior competência; neste sentido, Torner *et al.* (2004) relata que condições de cultivo inadequadas podem inibir o movimento mitocondrial para regiões mais internas do citoplasma e, portanto, afetar a maturação citoplasmática. Machatkova *et al.* (2012) descreve diferentes padrões mitocondriais segundo a competência meiótica e o nível de atresia dos oócitos. Bavister e Squirrell (2000) descrevem uma movimentação mitocondrial para a região que circunda o pronúcleo, e sua permanência aí até os estágios de clivagem. Ge; Sui; et

al. (2008) relatam dois padrões de distribuição mitocondrial para oócitos em estágio de MI e MII: padrão de congregação mitocondrial parcial e padrão de congregação completa, respectivamente.

A distribuição das mitocôndrias nas regiões perinuclear e periférica está de acordo com seus papéis fisiológicos durante as fases da meiose. A distribuição mitocondrial perinuclear pode relacionar-se com seu hipotético papel de fornecer energia para a migração cromossômica. (Ebert *et al.*, 1988). Em humanos os *clusters* mitocondriais próximos à cromatina e na periferia do ooplasma são importantes no controle local do pH intracelular, na função proteica e na organização do citoesqueleto (Eichenlaub-Ritter *et al.*, 2004). A maturação *in vitro* também influencia a qualidade da movimentação mitocondrial, levando a um movimento incompleto das mitocôndrias em direção as regiões mais internas do citoplasma, afetando a maturação citoplasmática (Torner *et al.*, 2004).

Stojkovic (2001) encontrou uma frequência significativamente maior de mitocôndrias distribuídas na região central em oócitos de folículos médios que em oócitos de folículos pequenos em estágio de VG. No entanto, em estágio MII, não há diferença na frequência de oócitos com mitocôndrias distribuídas centralmente entre estas subpopulações. A alta atividade mitocondrial e a realocização das mitocôndrias ao longo do ooplasma são mais frequentes para oócitos com boa morfologia e maior competência de desenvolvimento do que para oócitos com baixa morfologia e menor potencial de desenvolvimento. (Torner *et al.*, 2004).

Sabe-se que a distribuição das mitocôndrias dentro do oócito indica a necessidade de energia e íons ao longo de vários eventos-chave durante a maturação oocitária, a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial (Sun, Q. *et al.*, 2001), e que as disfunções ou anormalidades mitocondriais no oócito podem ser um determinante crítico na competência de desenvolvimento embrionário. A disfunção mitocondrial no oócito pode não só comprometer os processos de desenvolvimento, induzindo defeitos cromossômicos, mas também desencadear a apoptose no embrião.

A redistribuição mitocondrial e sua atividade oxidativa são essenciais para a apoptose das células *Cumulus* durante a maturação dos ovócitos. A distribuição homogênea difusa mitocondrial está correlacionada com baixa atividade oxidativa e baixos níveis de apoptose das células do *Cumulus*, enquanto a distribuição homogênea granulada está correlacionada com a alta atividade oxidativa e altos níveis de apoptose das células do *Cumulus* (Torner *et al.*, 2004).

Supõe-se que, no citoplasma de oócitos, as mitocôndrias e gotas lipídicas deveriam residir em proximidade. Isso foi comprovado para ovinos (Cran et al (1980) citado por Ambruosi *et al.* (2009) , bovinos (Hyttel e Greve e *et al.*, 1989) e suínos (Sun, Q. *et al.*, 2001); as mitocôndrias e gotas lipídicas se associam, formando "unidades metabólicas" que tendem a se acumular na periferia / córtex do oócito.

Stojkovic (2001) demonstrou que a reorganização mitocondrial e os níveis de ATP são diferentes entre oócitos de boa morfologia e de morfologia desfavorável e podem, pelo menos em parte, ser responsáveis por sua diferente capacidade de desenvolvimento após a FIV. As alterações na atividade mitocondrial diferem em oócitos levemente atrésicos em comparação com oócitos mais saudáveis, tanto em oócitos mais como menos competentes meioticamente. Os oócitos meioticamente mais competentes formam clusters e produzem ATP durante todo o tempo de maturação até sua conclusão, enquanto oócitos mais competentes levemente atrésicos e oócitos

mais saudáveis e menos competentes reduzem essas atividades anteriormente, no início da MII. Contrariamente a estas categorias de oócitos, oócitos ligeiramente atrésicos aumentam significativamente a formação de clusters antes da retomada da meiose. Desta forma, oócitos bovinos com diferentes graus de saúde/atresia e diferentes competências meióticas e saúde diferem na cinética dos padrões mitocondriais durante a maturação (Jeseta *et al.*, 2014).

3.4.3 Eventos moleculares da maturação nuclear e citoplasmática

O segundo aspecto da maturação, que muitas vezes é considerado parte do processo de maturação citoplasmática, é o acúmulo de moléculas específicas, em grande parte não identificadas, que preparam o oócito para eventos pós-fertilização. Este processo foi definido por Humblot *et al.* (2005) como capacitação oocitária, e descrito por Sirard, M.A. *et al.* (2006) como maturação molecular.

A maioria dos oócitos totalmente crescidos passa por um processo de maturação meiótica e citoplasmática normal, mas apenas um subconjunto deles se desenvolve até o estágio de blastocisto. A diferença entre um oócito competente para o desenvolvimento e um incompetente pode estar relacionada ao estado de diferenciação do folículo de origem e essas diferenças nem sempre são visíveis no oócito no nível ultra estrutural. Atualmente, a hipótese mais popular é que mRNA específicos e possivelmente algumas proteínas são produzidas e adicionadas ao estoque do oócito nos últimos dias antes da ovulação. Esses fatores "capacitadores" determinariam o desfecho pós-ovulação, alterando a capacidade de desenvolvimento do oócito (Sirard, M.A. *et al.*, 2006). Infere-se que instruções especiais, provenientes de um ambiente folicular específico e acumuladas no oócito, sejam essenciais para promover as cascatas moleculares adequadas para a ativação do genoma embrionário e o desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Como não foram identificadas discrepâncias claras associadas à maturação nuclear e citoplasmática responsáveis pela competência de desenvolvimento, acredita-se que as alterações moleculares representem a associação mais próxima com a capacidade intrínseca de um oócito de chegar até o estágio de blastocisto e estágios posteriores (Sirard, M.A. *et al.*, 2006).

3.4.4 Modificações ultraestruturais do oócito

Várias mudanças estruturais podem ser observadas nas organelas citoplasmáticas durante a maturação oocitária. Este rearranjo de organelas citoplasmática, altamente relacionado ao estágio de meiose do oócito, é necessário para a progressão da maturação e para uma fertilização monospermica (Paulini *et al.*, 2014).

No folículo primordial, o oócito está cercado por uma camada de células da granulosa achatadas, a relação núcleo/ citoplasma é grande, o núcleo é geralmente excêntrico e a maioria das organelas estão no ooplasma perinuclear. As mitocôndrias estão localizadas centralmente e são arredondadas. O córtex oocitário apresenta inúmeras vesículas recobertas por membrana (coated pits), por meio das quais o oócito se comunica com as células da granulosa por endocitose (Kacinskis *et al.*, 2005).

No folículo primário as mitocôndrias se alongam, o núcleo vai para a periferia do oócito e se veem microvilosidades curtas no oolema (Hyttel e Greve *et al.*, 1989; Kacinskis *et al.*, 2005)

No folículo secundário o oócito está circundado por um número variado de camadas de células da granulosa cuboides. O complexo de Golgi é responsável pela produção de grânulos corticais e pela deposição da zona pelúcida (ZP), que está sendo formada, levando à perda da proximidade entre o oócito e as células da granulosa; a comunicação intercelular deixa de ser por endocitose e são desenvolvidas as junções *gap*. São observados pequenos grumos de grânulos corticais em vesículas circundadas por membranas e o nucléolo adquire uma estrutura fibrilo-granular (Hyttel e Greve *et al.*, 1989; Kacinskis *et al.*, 2005).

No folículo terciário tardio, as organelas se deslocam para a região periférica, o tamanho do complexo de Golgi aumenta e aumenta também o número de vesículas e gotas lipídicas. O nucléolo é inativado e se torna uma esfera de fibrilas empacotadas (Hyttel e Greve *et al.*, 1989). O envoltório nuclear começa a ficar irregular (Fair, T. *et al.*, 1995). A zona pelúcida apresenta fibrilas dispostas em feixes cilíndricos distribuídos em camadas concêntricas de cerca de 250 nm de diâmetro, orientadas paralelamente à superfície do oócito (Fléchon *et al.*, 2004).

Enquanto no estágio de folículo secundário os grânulos corticais se encontram agrupados no córtex profundo dos oócitos, posteriormente migram progressivamente em direção a áreas sub-plasmalena. Essa movimentação estratégica para a periferia do oócito é um passo importante na maturação citoplasmática e é a mudança ultra estrutural mais aparente do processo de maturação citoplasmática (Cran, 1989). Quando o oócito está em metáfase II os grânulos se encontram alinhados à superfície interna da membrana plasmática; a liberação do seu conteúdo após a fertilização promove uma modificação na matriz extracelular impedindo a polispermia (Ferreira *et al.*, 2009). A presença de microvilosidades eretas e um espaço perivitelínico desenvolvido também contribuem para evitar a polispermia (Paulini *et al.*, 2014).

Antes da onda de LH as mitocôndrias se encontram em posição geralmente periférica, organizadas de forma difusa; mais internamente às mitocôndrias, aparecem elementos do retículo endoplasmático rugoso (RER) e numerosas vesículas circundadas por membrana com partículas semelhantes a ribossomos em sua superfície externa. As primeiras mudanças visíveis após o pico de LH são a formação do espaço perivitelínico, com perda de contato entre as células do *Cumulus* e o oócito, e um envelope nuclear irregular. Essas mudanças são seguidas pela retomada da meiose (quebra da vesícula germinativa), pelo desaparecimento do RER e pela formação de aglomerados de mitocôndrias (clusters) em associação com gotículas lipídicas e elementos do retículo endoplasmático liso (REL). O período entre 8 e 19 h após o pico de LH é caracterizado por agrupamento intensivo de mitocôndrias em associação com gotículas lipídicas e elementos do REL, fusão de vesículas e aparecimento de ribossomos no citoplasma. Posteriormente à extrusão do corpo polar, a maioria das organelas se desloca para o centro da célula. A região cortical, relativamente livre de organelas, contém grânulos corticais imediatamente adjacentes à membrana plasmática juntamente com agregados de REL tubular. As células do *Cumulus* se expandem, o espaço perivitelínico se desenvolve para evitar a polispermia, e o complexo de Golgi praticamente desaparece (Kruip *et al.*, 1983).

O padrão ultra-estrutural de distribuição das mitocôndrias e dos grânulos corticais está bem estabelecido em relação ao grau de maturação nuclear (Hyttel *et al.*, 1997; Torner *et al.*, 2004). As mitocôndrias se movimentam de uma posição mais periférica, antes da onda do LH, para uma distribuição mais difusa pelo citoplasma, e apresentam uma formação em clusters (conglomerados) corticais nos estágios finais da maturação nuclear que progride para uma distribuição mais dispersa após a extrusão do corpúsculo polar; quando o oócito chega a metáfase II as mitocôndrias e as gotas lipídicas estão em posição mais central no ooplasma (Paulini *et al.*,

2014). A redistribuição mitocondrial no oócito e sua associação com gotas lipídicas e com o retículo endoplasmático liso pode resultar da alta demanda de ATP e cálcio durante a maturação citoplasmática. Os triglicérides são metabolizados por beta-oxidação e no ciclo do ácido tricarboxílico dentro da matriz mitocondrial (Ambruosi *et al.*, 2009). Em ovinos, bovinos e caprinos, está comprovada esta associação entre mitocôndrias e gotas lipídicas, formando "unidades metabólicas" que tendem a se acumular na periferia / córtex do oócito (Sutton, M. *et al.*, 2003). Dados em oócitos humanos e bovinos sugerem que a eficiência da respiração mitocondrial em oócitos está intimamente correlacionada com a taxa de desenvolvimento embrionário após a fertilização (Torner *et al.*, 2004).

3.4.5 A zona pelúcida e suas modificações durante a maturação

A zona pelúcida (ZP) é uma rede porosa tridimensional, de aproximadamente 15 µm de espessura, composta por filamentos sulfatados de glicoproteína (ZP2, ZP3 e ZP4 no bovino) dispostos em fibrilas, que envolve oócitos e embriões de mamíferos (Noguchi *et al.*, 1994).

Vários estudos supõem uma correlação entre o tipo de morfologia da superfície da ZP e o grau de maturação oocitária. Calafell *et al.* (1992) descreve uma superfície tipo rede como sendo a predominante em oócitos maduros, enquanto oócitos imaturos e degenerados apresentam uma ZP compacta e sem poros. PAPI *et al.* (2010) descreve um aumento da rugosidade na superfície da ZP de oócitos maturados e descreve a ZP de oócitos fertilizados (Fig. 3) com uma superfície mais compacta, em contraste com a de oócitos maturados.

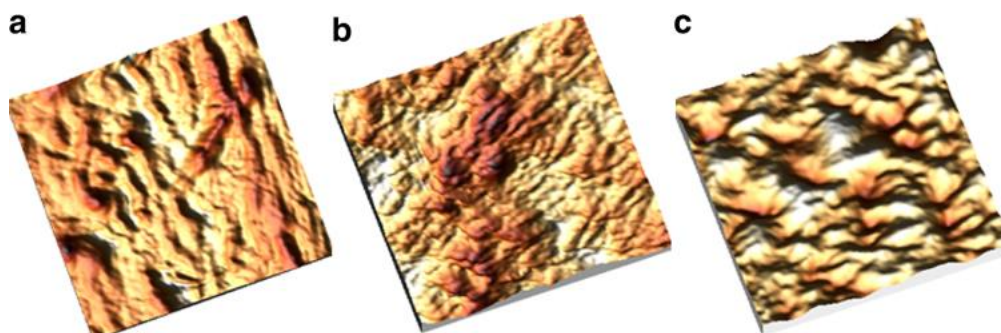


Figura 3. Imagens de força atômica (15 x 15 µm) de zona pelúcida bovina isolada de oócitos bovinos imaturos (a), maturados (b) e fertilizados (c). A topografia da superfície mostra uma malha densa de feixes de fibrila de diferentes diâmetros dispostos de maneira desuniforme (Papi *et al.*, 2010).

Papi *et al.* (2012) demonstrou que, tanto nas camadas internas como externas da ZP, a rigidez diminui com a maturação e, contrariamente, aumenta após a fertilização. Em nanoescala, durante a maturação, ambas as camadas apresentaram uma rede de filamentos finos cujo comprimento aumenta, enquanto a espessura diminui. Após a fertilização, os filamentos recuperam parcialmente as características imaturas, aparecendo novamente mais curtos e mais espessos.

Vários experimentos avaliaram a susceptibilidade da zona pelúcida à digestão por diferentes enzimas como a pronase, a tripsina, a alfa-quimotripsina, a B-glicuronidase, a papaína e a bromelina (Gwatkin, 1963; Moor e Cragle, 1971). O endurecimento da zona pelúcida geralmente é avaliado determinando o tempo necessário para sua digestão com pronase ou quimotripsina. A pronase apresenta a maior atividade proteolítica (Gwatkin, 1963).

O tempo de digestão enzimática da zona pelúcida depende da espécie dos animais, do estado fisiológico do oócito (fertilizado versus não fertilizado) e, no caso dos embriões, do estágio de desenvolvimento (Gwatkin, 1963; Moor e Cragle, 1971; Menino e Wright, 1982).

Recentemente várias técnicas foram desenvolvidas para medir a elasticidade da ZP; Khalilian *et al.* (2011) demonstraram que o endurecimento da ZP é acompanhado por um aumento na rigidez mecânica em camundongos, suínos, bovinos e humanos (Murayama *et al.*, 2006; Papi *et al.*, 2010). No entanto, poucos estudos investigaram as alterações mecânicas da ZP antes da fertilização (Murayama *et al.*, 2006; Papi *et al.*, 2010).

Murayama *et al.* (2013), em camundongos, avaliou a ZP de oócitos imaturos em estágio de vesícula germinativa (GV), oócitos maturados em metáfase II (MII) e oócitos fertilizados. Os resultados de medição da elasticidade da ZP e tempo de digestão com 0,25% de alfa-quimotripsina demonstram claramente que a ZP ficou menos rígida durante a maturação dos oócitos e mais rígida após a fertilização, tanto no sentido de endurecimento mecânico como de maior resistência à digestão. Se, por um lado, o endurecimento da ZP pós-fertilização pode ser explicado pela liberação do conteúdo dos grânulos corticais, o mecanismo de perda de rigidez da ZP é totalmente desconhecido. A ZP ficou três vezes menos rígida pós maturação e aproximadamente duas vezes mais rígida após a fertilização, enquanto o tempo de digestão diminuiu 78 vezes e aumentou 106 vezes, respectivamente. Simplificando, uma maior elasticidade foi mostrada após a maturação, enquanto um maior tempo de digestão foi mostrado após a fertilização. O menor endurecimento da ZP avaliado por meio de sensor para medição de elasticidade pode ser um critério adicional para a seleção de oócitos de maior qualidade para fertilização *in vitro* na reprodução assistida de humanos (Murayama *et al.*, 2013).

Após a penetração do espermatozoide, os grânulos corticais liberam seu conteúdo no espaço perivitelínico, em um evento denominado reação cortical. O conteúdo dos grânulos altera as propriedades da ZP, no que é conhecido como reação de zona, e bloqueia a penetração polispérmica por meio de um processo de "endurecimento da ZP" (De Felici *et al.*, 1985). Superficialmente, o termo parece indicar uma alteração das propriedades físicas da ZP, mas o que normalmente se entende por endurecimento da zona não é apenas uma rigidez aumentada, e sim também uma maior resistência da ZP à digestão proteolítica, normalmente testada com alfa-quimotripsina; o aumento da resistência à digestão com quimotripsina nem sempre é acompanhado por um aumento da rigidez mecânica (Noguchi *et al.*, 1994).

O endurecimento da ZP, induzido logo após a fertilização pela exocitose dos grânulos corticais, embora comum em mamíferos (Sun, Q. Y., 2003), não ocorre em todas as espécies. Os oócitos maduros de suínos e bovinos *in vitro* não apresentam endurecimento da ZP após a FIV, mas sim experimentam um endurecimento pré-fertilização durante o trânsito ao longo da tuba uterina, devido à ação de um complexo proteico heparina-glicoproteína específico da tuba, que dificulta a interação dos espermatozoides com o oócito e, portanto, contribui para a prevenção da polispermia (Coy e Cánovas *et al.*, 2008). Kolbe e Holtz (2005) também demonstraram que a ZP de oócitos bovinos e suínos, na tuba, pós ovulação natural, é resistente à digestão enzimática, que leva de horas a dias. Uma vez que a ZP de oócitos suínos e bovinos pré-ovulatórios é digerida por enzimas em aproximadamente 4 min, o endurecimento da ZP deve ocorrer na tuba independentemente da fertilização. No caso dos oócitos bovinos, o grau de endurecimento da zona pelúcida, portanto, não influencia a taxa de fertilização, pelo menos no caso de oócitos maturados *in vitro* (Coy e Grullon *et al.*, 2008).

A falta deste endurecimento pré-fertilização ou, alternativamente, uma liberação defeituosa ou incompleta do conteúdo dos grânulos corticais (Hyttel e Callesen e *et al.*, 1989) durante os protocolos de FIV pode explicar a incidência elevada de polispermia em ungulados (Coy e Grullon e *et al.*, 2008). Recentemente PAPI *et al.* (2010) demonstraram que, apesar da falta de um endurecimento bioquímico pós-fertilização, a rigidez da camada externa da ZP é significativamente aumentada após a fertilização *in vitro* de oócitos bovinos. Portanto, na FIV de bovinos, as modificações biomecânicas da ZP parecem ineficazes em dificultar a interação dos espermatozoides, o que destaca a relevância dos mecanismos adicionais que atuam *in vivo*.

No entanto, em algumas espécies o grau de endurecimento da ZP (Katska *et al.*, 1989) pode afetar a capacidade de fertilização do oócito e o desenvolvimento embrionário subsequente. Em camundongos (Gianfortoni e Gulyas, 1985), estabeleceu-se uma relação direta entre um aumento do tempo de digestão da ZP de oócitos sem *Cumulus* e uma diminuição nas taxas de fertilização.

A ultraestrutura da ZP também pode afetar a capacidade de fertilização do oócito e seu desenvolvimento embrionário (Choi *et al.*, 2013). Poros de grande diâmetro podem ajudar a orientar os espermatozoides durante a penetração de oócitos (Suzuki *et al.*, 1994). Alta incidência de polispermia foi relatada em CCOs de baixa qualidade com alto número de poros de ZP de grande diâmetro, e poros de pequeno diâmetro estão correlacionados com qualidade superior de oócitos e alta taxa de blastocistos (Santos, P *et al.*, 2008).

Funahashi *et al.* (2000) avaliaram a ZP de oócitos suínos ovulados e de maturados *in vitro* (MIV) e compararam as alterações morfológicas antes e após a fertilização *in vitro* e *in vivo*, respectivamente, com microscopia eletrônica de varredura (Fig. 4 e 5). O diâmetro médio da ZP intacta, bem como a sua espessura média, foi maior nos oócitos ovulados que nos oócitos MIV. A espessura média da ZP foi maior em oócitos ovulados. A espessura da ZP foi maior em zigotos que em oócitos *in vivo*, enquanto a de zigotos MIV-FIV não diferiu da dos oócitos MIV. Os oócitos suínos maturados *in vivo* apresentaram estrutura tipo malha, com numerosas fenestrações, enquanto os maturados *in vitro* são mais compactos e lisos, indicando maturação incompleta da ZP. Estes resultados indicam que a morfologia da ZP e a reação da ZP na penetração pelo espermatozoide são diferentes entre oócitos MIV e ovulados.

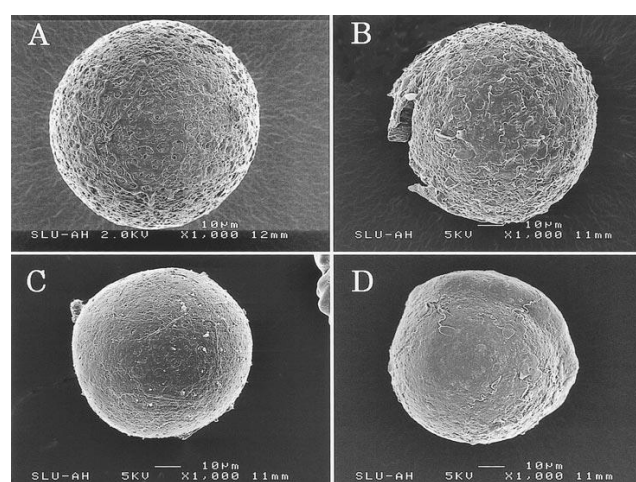


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura da superfície externa de zona pelúcida de oócitos e zigotos suínos. **A)** Oócito ovulado. **B)** Zigoto coletado da tuba. **C)** Oócito de MIV. **D)** Zigoto de MIV-FIV (Funahashi *et al.*, 2000)

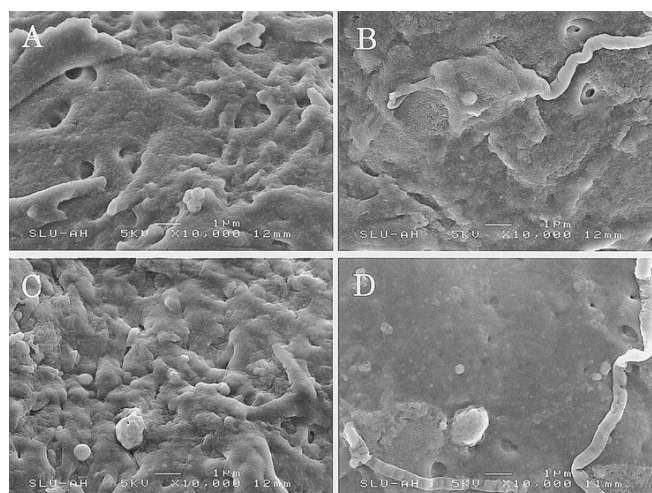


Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura da superfície externa de zona pelúcida de suíno. A) Oócito ovulado. B) Zigoto coletado da tuba. C) Oócito de MIV. D) Zigoto de MIV-FIV (Funahashi et al., 2000)

Choi *et al.* (2013) relatam mudanças na ultraestrutura da zona pelúcida de complexos *Cumulus*-oócitos (CCOs) co-maturados *in vitro* com oócitos desnudos. Estes CCOs apresentam maior taxa de blastocistos que CCOs maturados sem oócitos desnudos (ODs), provavelmente devido a uma maturação nuclear e citoplasmática melhorada pelos fatores de secreção do oócito (OSFs) secretados pelos ODs. Verificou-se aumento, na ZP, no número de poros de pequeno diâmetro nos grupos COC/ DO. Aumento significativo na taxa de blastocistos e no número de células dos blastocistos em grupos CCO-OD foi associado a mudanças na ultraestrutura da ZP após a exposição aos ODs e seus fatores secretados. A polispermia também é reduzida em grupos de CCOs em co-cultivo com ODs (Dey *et al.*, 2012).

3.5 A MATURAÇÃO *IN VITRO*

A produção de embriões *in vitro* ainda é muito diferente da produção *in vivo*. É possível atingir taxas de blastocistos de até 70% se forem usados oócitos maturados *in vivo*; no entanto, se são maturados *in vitro* as taxas de blastocisto caem pela metade, em torno de 30 a 40%. Na produção *in vitro*, os oócitos são recuperados de folículos de 3 a 8 mm; diferentemente dos oócitos que ovulam *in vivo*, esses oócitos não se desenvolveram até o estágio pré-ovulatório e necessitam passar pelo processo de maturação *in vitro*. Oócitos de folículos subordinados representam sempre uma população heterogênea quanto à sua competência de maturação citoplasmática (Machatkova *et al.*, 2012). A competência de maturação citoplasmática de um oócito, da mesma forma que sua competência para a meiose, correlaciona-se estreitamente com o tamanho do folículo a partir do qual o oócito foi removido. Oócitos bovinos provenientes de folículos com um diâmetro médio de mais de 6 mm produzem uma maior taxa de blastocisto *in vitro* do que aqueles de folículos de 2 a 6 mm. Os folículos maiores ou que crescem lentamente têm demonstrado promover oócitos melhores do que folículos menores ou que crescem ativamente (Sirard, M. *et al.*, 2006). Há que se considerar o efeito da seleção oocitária que ocorre durante o processo fisiológico natural; *in vivo* são selecionados apenas os melhores oócitos, diferentemente do que acontece *in vitro* (Wrenzycki e Stinshoff, 2013).

Muitos estudos foram conduzidos visando desenvolver formas não invasivas para selecionar oócitos mais competentes, como a extensão e o grau de compactação das células do *Cumulus* e a granulação do ooplasma. As condições de cultivo *in vitro* foram aprimoradas nos últimos anos, principalmente pelo ajuste das formulações dos meios; no entanto, os protocolos de maturação *in vitro* (MIV) permanecem quase invariáveis. A manutenção ou a mimetização, *in vitro*, da situação *in vivo* auxiliará na melhora da qualidade e da competência de desenvolvimento do oócito maturado (Wrenzycki e Stinshoff, 2013).

Supõe-se que a qualidade do oócito se baseie na presença do conjunto apropriado de mRNA e proteínas armazenadas durante a foliculogênese (Minami *et al.*, 2007). Evidências experimentais em bovinos mostram que o meio, seus suplementos e outros fatores (por exemplo, a atmosfera de oxigênio) utilizados para a maturação dos oócitos podem influenciar a expressão e desenvolvimento de RNAm dos embriões resultantes (Hashimoto, S., 2009). Além disso, o perfil de metilação de embriões de origem diferente (transferência nuclear *in vitro*, *in vivo* ou de células somáticas (SCNT)) difere de acordo com o seu método de produção. Não foram detectadas diferenças significativas nas marcas epigenéticas em oócitos de MIV comparados com suas contrapartes maturados *in vivo*, indicando que os protocolos atuais de MIV não têm ou têm apenas efeitos marginais em marcas epigenéticas críticas. No entanto, os distintos perfis de expressão de mRNA de oócitos maturados *in vivo* sugerem um impacto direto da MIV nos oócitos, que pode não ser mediado principalmente pela metilação do DNA, mas pode envolver outros mecanismos regulatórios, como micro RNAs (Heinzmann *et al.*, 2011).

O fluido folicular (FF) contém uma variedade de proteínas, citocinas / fatores de crescimento e outros hormônios peptídicos, esteroides, metabolitos energéticos e outros fatores indefinidos (Sutton, M. *et al.*, 2003). A presença e o crescimento do folículo afetam os níveis de nutrientes que chegam ao oócito, e as condições intrafoliculares influenciam a competência de desenvolvimento dos oócitos. A composição do fluido folicular varia entre os folículos e depende de seu tamanho e estrutura. Além disso, os fatores secretados pelo oócito (OSFs), além de regular a função das células do *Cumulus* e a competência de desenvolvimento do oócito, regulam também a composição do líquido folicular (Gilchrist, R. *et al.*, 2008). Cada folículo antral possui uma composição única de fluido folicular e, apesar de vários estudos, ainda não está claro como reproduzir, na maturação *in vitro*, o ambiente folicular para desenvolver oócitos com sucesso (Orsi *et al.*, 2005).

O sucesso da MIV sofre com as diferenças entre a composição dos meios de cultura em comparação com as condições *in vivo* (Sutton *et al.*, 2003). Os dados de Orsi *et al.* (2005) indicam que o perfil de nutrientes do fluido de folículos pré-ovulatórios de bovinos difere do perfil dos meios de maturação *in vivo*, talvez sendo este um dos fatores responsáveis pela baixa competência de desenvolvimento de oócitos maturados *in vitro*, e chama a atenção para a necessidade de um meio de maturação mais fisiológico em termos nutricionais. A compreensão das condições intrafoliculares é fundamental para a seleção e maturação bem-sucedida dos oócitos, independentemente das espécies. Mais recentemente, uma abordagem em duas fases (pré-MIV e MIV estendida) se mostrou promissora para melhorar a competência de desenvolvimento de complexos *Cumulus*-oócitos (Albuz *et al.*, 2010).

3.5.1 Efeitos das gonadotrofinas hipofisárias e hormônios esteroides

As gonadotrofinas FSH e LH são os hormônios mais comumente utilizados nos sistemas de MIV. (Sutton, M. L. *et al.*, 2003). FSH e LH são suplementados para induzir a expansão das células do *Cumulus* e a maturação nuclear e citoplasmática (Caixeta *et al.*, 2013). Também promovem aumento da glicólise e aumento da oxidação mitocondrial da glicose nos oócitos. O LH altera a distribuição de cálcio no ooplasma e eleva o metabolismo de glutamina no oócito (Zuelke e Brackett, 1993). Algumas hipóteses explicam a ação do LH: (i) o FSH estimula o aparecimento de receptores de LH nas células do *Cumulus*, permitindo que o LH ative mensageiros intracelulares; (ii) o LH induz um aumento nos níveis de AMPc que pode ser potencializado pelos níveis de AMPc gerados pelo FSH. O AMPc então ativa proteínas quinases e fosforilações proteicas intracelulares; (iii) o LH estimula outros segundos-mensageiros que regulam a resposta celular junto com AMPc). O LH não influencia a expansão do *Cumulus* e nem a maturação nuclear de oócitos cultivados *in vitro* na ausência de FSH ou AMPc, mas exerce estes efeitos quando o FSH está presente (Eppig, J. J.; Downs, 1984).

Os hormônios esteroides também desempenham um papel importante durante a maturação meiótica de oócitos de mamíferos *in vivo* e *in vitro*. Nos folículos pré-ovulatórios de mamíferos, o aumento de LH estimula inicialmente a secreção de andrógenos e estrógenos. As concentrações de estrógenos diminuem 6 h após o aumento do LH, e em seguida ocorre uma diminuição de andrógenos e um aumento na concentração de progesterona (García-Herreros *et al.*, 2010). A adição de FSH ao meio de cultivo também estimula a produção de progesterona (Vanderhyden, 1993).

O papel da progesterona (P4) na maturação dos oócitos de mamíferos e seu potencial impacto sobre a qualidade dos oócitos vêm sendo amplamente estudado (Fair, T. *et al.*, 2001). A secreção de progesterona aumenta tardiamente no período pré-ovulatório em folículos expostos ao LH *in vivo* e *in vitro*; 18 h após o aumento do LH, a progesterona constitui 90% do conteúdo de esteroides intrafoliculares. Como a progesterona aumenta próximo à ovulação, quando a maturação do oócito está se completando, supõe-se que ela não interfira com a retomada da meiose ou com a facilitação da maturação induzida pela queda anterior da concentração de outros esteroides no folículo (Smith e Tenney, 1980).

As células do *Cumulus* de CCOs bovinos são capazes de secretar estradiol e progesterona em sistemas de maturação *in vitro* e esta esteroidogênese é modulada pelos esteroides progesterona, testosterona e estradiol. O estradiol sensibiliza as células da granulosa na resposta às gonadotrofinas e estimula a proliferação e diferenciação das células da granulosa (Smith e Tenney, 1980); costuma ser adicionado ao meio de MIV porque sua ação é considerada favorável, embora não se conheçam tão bem seus efeitos na maturação dos oócitos bovinos. No entanto, a adição de estradiol ao meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos deve ser revisada, pois as células do *Cumulus* de CCOs secretam estradiol no meio de maturação (Mingoti *et al.*, 2002). Além disso, em altas concentrações o estradiol pode exercer efeito adverso na formação do fuso e na extrusão do corpúsculo polar (Beker *et al.*, 2002). Recentemente, foi demonstrado que as concentrações de progesterona (P4) e estradiol no meio são reduzidas devido à alta capacidade de absorção do óleo mineral utilizado para recobrir as gotas do meio de maturação (Clemente *et al.*, 2009; Wrenzycki e Stinshoff, 2013).

Os CCOs de mamíferos possuem várias enzimas esteroidogênicas importantes e secretam testosterona durante a maturação *in vitro* (Schoenfelder *et al.*, 2003). A

adição de testosterona exógena (100 nm) ao meio de maturação de oócitos selecionada com base em concentrações fisiológicas relatadas em folículos bovinos pré-ovulatórios (165 nm, Dieleman *et al.* (1983)) melhorou a competência de desenvolvimento de oócitos bovinos pós FIV (Younis *et al.*, 1989; Silva e Knight, 2000).

Estas alterações nas concentrações intrafoliculares de esteroides *in vivo* indicam que há um equilíbrio ou sequência de esteroides que leva à maturação completa dos oócitos nos folículos (García-Herreros *et al.*, 2010). A regulação da maturação *in vivo* difere da regulação da maturação *in vitro*: folículos pequenos possuem mRNA para receptores de FSH nas células murais da granulosa e mRNA para receptores de LH somente nas células da teca. À medida que os níveis de FSH aumentam, os folículos antrais são selecionados, tornam-se cada vez mais responsivos ao FSH e finalmente aparecem receptores de LH também nas células da granulosa. Isto permite o contínuo crescimento dos folículos selecionados em um período em que os níveis de FSH caem devido ao alto nível de estrógeno e inibina produzidos pelo folículo dominante (Driancourt, 2001). O início exato da expressão dos receptores de LH (LHR) nas células da granulosa é controverso. Já foram identificados transcritos de LHR em folículos de 4 mm em novilhas Gir (Wohlres-Viana *et al.*, 2017), mas outros autores detectaram LHR nas células da granulosa apenas em folículos maiores: 5.5mm (Ereno *et al.*, 2015), 7mm (Nogueira *et al.*, 2007). Com a queda dos níveis séricos de FSH e aumento da secreção pulsátil de LH, um ou mais folículos irão se desenvolver até se tornarem pré-ovulatórios. Os folículos pré-ovulatórios, além de responderem ao pico de LH, respondem à sua secreção pulsátil anterior ao pico ovulatório. As modificações pré-maturacionais do oócito ocorrem como resposta do folículo à esta pulsatilidade do LH antes do pico ovulatório e são pré-requisitos para o oócito alcançar a competência (Assey *et al.*, 1994).

A indução da maturação nuclear também ocorre de maneira diferente *in vivo* e *in vitro*: é induzida *in vivo* pelo pico de LH e, *in vitro*, ocorre espontaneamente quando os oócitos são removidos do folículo e cultivados em meio de maturação (Pincus e Enzmann, 1935).

Para maximizar o sucesso na reprodução assistida é importante compreender melhor os diferentes passos fisiológicos do crescimento folicular até a diferenciação e, idealmente, reproduzir esse padrão normal usando a combinação certa de gonadotropinas. Por exemplo, pode ser fisiologicamente lógico aumentar o suporte de LH e diminuir o suporte de FSH à medida que a estimulação avança para refletir melhor os processos *in vivo* e promover um crescimento folicular lento final acompanhado de alta diferenciação, que resultará em melhores oócitos (Sirard, M. *et al.*, 2006).

3.5.2 Efeito dos fatores de crescimento

Um grande número de fatores de crescimento celular atua na função de células ovarianas, como os fatores de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) e II (IGF-II), interleucina 1 e fator de crescimento epidermal (EGF). A IGF-I estimula a MIV de oócitos bovinos; o EGF, na presença de FSH, aumenta o número de oócitos que se desenvolvem até blastocisto após a fertilização (Harper e Brackett, 1993). A IGF-I e a insulina estimulam a proliferação das células da granulosa *in vitro* e, na presença de FSH, estimulam também a produção de estradiol e progesterona (Spicer, L J *et al.*, 1993). A insulina estimula a expansão do *Cumulus* em CCOs e melhora a fertilização e a qualidade embrionária. IGF-I e EGF juntos estimulam a maturação nuclear de

oócitos bovinos em proporção maior que quando adicionados individualmente à cultura (Lorenzo *et al.*, 1994), além disto, também estimulam a expansão do *Cumulus*, o metabolismo oxidativo e a clivagem após FIV (Rieger *et al.*, 1998).

Uma melhor compreensão da regulação *in vivo* do desenvolvimento folicular e, em particular, da maturação final, em conjunto com a diferenciação de oócitos com base em fatores intrafoliculares e na comunicação intercelular levará a uma maturação *in vitro* melhorada, compensando a falta de desenvolvimento pré-ovulatório de oócitos imaturos (Wrenzycki e Stinshoff, 2013).

3.5.3 As células do *Cumulus* na maturação *in vitro*

As células do *Cumulus* desempenham papel crítico durante a maturação meiótica espontânea *in vitro*. Na retomada da meiose, suas projeções citoplasmáticas transzonais começam a se afastar do oócito e há quase a perda total da comunicação via *gap-junctions* quando os oócitos chegam à metáfase I. No entanto, durante esta fase as células do *Cumulus* continuam a se comunicar com o oócito, visto que a sua remoção antes da fertilização *in vitro* (FIV) resulta em fertilização comprometida e pior desenvolvimento embrionário quando comparada à sua remoção após a FIV, independentemente do co-cultivo pós-FIV com as células do *Cumulus* (Fatehi *et al.*, 2002).

A remoção/ausência das células do *Cumulus* durante a maturação *in vitro* tem efeito significativamente prejudicial na maturação, fertilização e aquisição de competência oocitária. Oócitos bovinos desnudos têm taxa de clivagem muito baixa (Sirard, M. *et al.*, 2006). Estudos demonstram que oócitos humanos desnudos exibem acelerada retomada da meiose *in vitro*, deficiência na capacidade citoplasmática de manter características da metáfase enquanto a meiose progride, propensão para se ativar espontaneamente após a interrupção da meiose e falta de coordenação entre a maturação nuclear e a citoplasmática (Combelles *et al.*, 2002). A ausência das células do *Cumulus* durante a MIV também afeta o metabolismo lipídico dos oócitos, levando a uma maturação citoplasmática sub-ótima e consequentemente reduzindo sua competência para o desenvolvimento (Auclair *et al.*, 2013).

Um dos critérios mais utilizados para seleção de oócitos para maturação *in vitro* (MIV) é a morfologia do complexo *Cumulus*-oócito (CCO), mais especificamente das camadas do *Cumulus* (Sutton, M. *et al.*, 2003). Fatores como número de camadas e seu grau de compactação e expansão estão relacionados a melhores resultados em termos de desenvolvimento (Goud *et al.*, 1998) e são utilizados como parâmetro de avaliação de oócitos bovinos maturados *in vitro* (Sutton, M. L. *et al.*, 2003).

Dragovic *et al.* (2005) relatam um sistema de classificação da expansão do *Cumulus*, com base em uma pontuação de 0 a 4, que gera um índice de expansão do *Cumulus*: 0 indica ausência de expansão e 4 indica expansão completa de todas as camadas do *Cumulus*.

3.5.4 Sistemas de maturação *in vitro* com co-cultivos celulares

Um dos principais gargalos relacionados à baixa taxa média de blastocistos obtidos na produção *in vitro* de embriões (de apenas 30 a 40% em bovinos) é o baixo desempenho dos oócitos maturados *in vitro*. Estes oócitos são retirados de folículos imaturos; sendo assim, ainda não passaram pelo processo de aquisição da competência que ocorre no

final do desenvolvimento folicular, logo após o pico de LH. Portanto, torna-se necessária a melhora da técnica de maturação *in vitro* (MIV) para permitir ao oócito se desenvolver *in vitro* de forma mimética à situação *in vivo* (Sirard, M. *et al.*, 2006).

As condições de cultivo na MIV ou se baseiam em células somáticas que não refletem o ambiente folicular *in vivo*, e/ou utilizam compostos complexos ou aditivos de natureza indefinida. Os conhecimentos adquiridos sobre o ambiente *in vivo*, os fatores que regulam a qualidade dos oócitos e a interação *Cumulus*-oócito podem ser aplicados para melhorar a eficiência da MIV, aumentando a eficiência da produção de embriões como um todo e oferecendo novas opções para o tratamento da infertilidade (Gilchrist, R. *et al.*, 2008).

Com o objetivo de melhorar a eficiência da produção *in vitro* e a qualidade dos embriões, sistemas de co-cultivo com diferentes tipos celulares homólogos e heterólogos vêm sendo usados, visando tirar proveito da ação de diferentes células, como células humanas (Parikh *et al.*, 2006) e de bovinos (Goovaerts *et al.*, 2011). Há dois principais mecanismos de ação sugeridos para os sistemas de co-cultivo: um mecanismo de condicionamento negativo, em que há remoção de substâncias potencialmente tóxicas/metabólitos e/ou do estresse oxidativo (hipoxantina, espécies reativas de oxigênio) do meio de cultura pelas células cocultivadas, e um mecanismo de condicionamento positivo, em que as células cocultivadas liberam fatores tróficos como nutrientes, substratos, fatores de crescimento, citocinas e outras proteínas no meio (Joo *et al.*, 2001).

As células epiteliais da tuba de mamíferos e as células da granulosa (GC) podem ser isoladas e cultivadas em meio de cultura. Os cultivos em monocamada destas células têm sido amplamente utilizadas para co-cultivo *in vitro* pelo seu efeito e interação diretos, que contribuem para o sucesso da fertilização (Kidson *et al.*, 2003; Romar *et al.*, 2003).

3.5.4.1. Co-cultivo com células da granulosa e do *Cumulus-oophorus*

As células da granulosa (CG) sofrem profundas alterações morfológicas e funcionais ao longo do desenvolvimento folicular devido à complexa dinâmica do folículo e apresentam distintos graus de diferenciação de acordo com sua localização folicular, estágio de crescimento do folículo e também de acordo com a fase do ciclo. São fontes abundantes de numerosos fatores, como o fator beta de transformação do crescimento (TGF- β), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), proteínas de ligação à IGF, ativinas e inibinas (Knight e Glistler, 2001). Dados sobre a diferenciação *in vitro* de CGs humanas e o perfil esteroidogênico das CGs cultivadas são importantes para o estabelecimento de um modelo de cultura de CG de suporte para a MIV de oócitos em vesícula germinativa (Vireque *et al.*, 2013).

In vivo, em resposta ao pico pré-ovulatório de LH, as células do folículo entram em etapa final de diferenciação e se luteinizam; este comportamento de segunda fase não é adequado para a MIV, porque enquanto o folículo está em desenvolvimento o oócito secreta fatores inibidores de luteinização para evitar a luteinização precoce do folículo (Spicer, LEO J. *et al.*, 2006). Segundo Vireque *et al.* (2013), os padrões de cultivo de células da granulosa descritos, principalmente em humanos, trabalham com estas células de segunda fase, granuloso-luteínicas, ou seja, que já sofreram ação do LH e têm perfil de produção hormonal desfavorável para o crescimento de folículos nos estágios mais precoces do seu desenvolvimento (Vireque *et al.*, 2013). São

caracterizados por um consistente declínio na produção de estradiol com o tempo de cultura (Luck *et al.*, 1990) enquanto a síntese de progesterona aumenta, sugerindo início de luteinização.

Em suínos, Yuan *et al.* (2016) relatam que, em oócitos maturados *in vitro*, a presença de P4 durante a maturação não inibiu a liberação do corpúsculo polar, e sim aumentou significativamente a glutatona e diminuiu as espécies reativas de oxigênio (EROs) em relação aos grupos controle. O número de células aumentou nos grupos tratados com P4 e, além disso, um inibidor específico da P4, mifepristona, impediu a maturação dos oócitos, levando a uma menor incidência de liberação do primeiro corpúsculo polar. Os autores sugerem que a progesterona aumenta a viabilidade dos oócitos suínos e sua capacidade de desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Vireque *et al.* (2013) relatam que meios sem soro fetal bovino e albumina, ou seja, meios quimicamente definidos, tem a capacidade de promover a reversão, ao menos parcialmente, da luteinização. CGs cultivadas em meio sem soro e albumina apresentam características morfológicas similares às CG *in vivo*. As células mantêm a forma poliédrica, aumentam de diâmetro, tornam-se compactadas e crescem em suspensão formando clusters, secretando altas concentrações de estradiol, mantendo alta relação estradiol/progesterona, que indica manutenção da atividade da aromatase típica da fase folicular. As células cultivadas em meios com soro crescem em monocamada e apresentam formato alongado semelhante a fibroblasto, com microvilosidades, evaginações e protrusões da membrana plasmática, compatíveis com instalação do processo de luteinização (Fig. 6). Há diminuição da produção de estradiol e androstenediona e aumento na secreção de progesterona, com produção sustentada durante todo o período de cultivo (Langhout *et al.*, 1991).

Gutiérrez e Campbell e *et al.* (1997) demonstraram efeitos negativos da adição do soro ao meio de cultivo na produção de estradiol *in vitro* por CG bovinas. O padrão de formação de clusters de CG em sistemas livres de soro possibilita um íntimo contato físico entre as células e isso pode ser responsável por prevenir a luteinização (Gutiérrez e Campbell e *et al.*, 1997; Gutiérrez e Glazyrin e *et al.*, 1997a). Essa morfologia de crescimento típica também é observada em culturas de CG de outras espécies, como ovinos (Campbell *et al.*, 1996) suínos (Picton *et al.*, 1999) e bovinos (Gutiérrez e Glazyrin e *et al.*, 1997a).

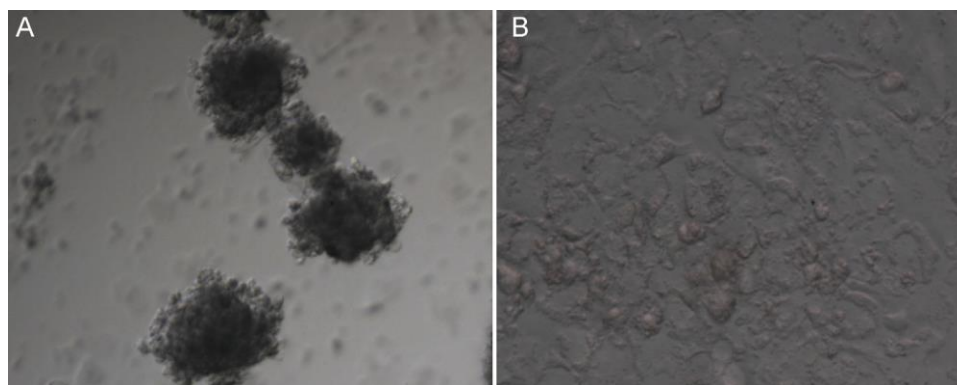


Figura 6. Padrão de crescimento de células da granulosa humanas em sistema de cultura convencional ou quimicamente definido. A, crescimento característico em suspensão (clusters) das células da granulosa cultivadas em meio sem soro; B, monocamada de células da granulosa em cultivo em meio com soro (Vireque *et al.*, 2013). Microscópio Invertido acoplado a Micro manipulador Nikon Diaphot 300. 200X.

3.5.4.2. Meios condicionados nos sistemas de maturação *in vitro*

Apesar dos efeitos positivos dos co-cultivos celulares, alguns laboratórios preferem utilizar meios condicionados, por razões sanitárias e por praticidade. Estes meios podem ser armazenados congelados e o mesmo lote do meio pode ser usado para várias repetições, e também pode ser fornecido de maneira quase tão simples quanto um meio livre de células (Malekshah *et al.*, 2006).

Meio condicionado é um meio sem células, porém já parcialmente utilizado por células e portanto enriquecido com produtos da secreção celular, como fatores de crescimento e fatores embriotróficos (Dirnfeld *et al.*, 1997). Sugere-se que os efeitos dos meios condicionados, além de ocorrerem por meio de fatores solúveis, ocorram via vesículas extracelulares (VEs), que permanecem no meio após secretadas pelas células cultivadas. As VEs são consideradas uma nova classe de comunicação celular; os exossomos (origem na membrana endossomal) e as microvesículas (vesículas liberadas da membrana plasmática) são os principais tipos de VEs (Camussi *et al.*, 2010).

Evidências crescentes indicam que as VEs desempenham um papel fundamental na comunicação célula-célula. Podem estimular diretamente as células alvo por interações mediadas por receptores ou podem ser transferidas da célula de origem para várias moléculas bioativas, incluindo receptores de membrana, proteínas, mRNAs, microRNAs e organelas. Estão envolvidas em processos de sinalização imune, angiogênese, resposta ao estresse, senescência, proliferação e diferenciação celular (De Jong *et al.*, 2014).

O papel das VEs na aquisição de competência dos gametas e no desenvolvimento embrionário ainda é desconhecido. Recentemente, exossomos e microvesículas foram encontradas em diferentes fluídos corporais contendo material bioativo, incluindo miRNAs. Da Silveira *et al.* (2012) demonstraram que exossomos presentes no líquido folicular modulam a maturação de células da granulosa de folículos ovarianos em crescimento, e observaram presença de exossomos no interior das células da granulosa e células do *Cumulus*, sugerindo que estes tipos celulares produzam e liberem as VEs para o fluido folicular (Da Silveira *et al.*, 2015a).

Os resultados na literatura diferem sobre os efeitos de meios condicionados por diferentes células somáticas no desenvolvimento embrionário. Alguns estudos mostraram que os meios condicionados são tão eficazes quanto suas próprias células em co-cultivo (Hernandez-Ledezma *et al.*, 1995; Kobayashi *et al.*, 1992; Lee, Y. L. *et al.*, 2003; Mermillod *et al.*, 1993). Outros estudos, no entanto, revelam que eles reproduzem parcialmente os efeitos das células (Maeda *et al.*, 1996; Stojkovic *et al.*, 1997); e, finalmente, há um terceiro grupo de pesquisadores que indicam que os meios condicionados não exercem quaisquer efeitos adicionais benéficos em comparação com os meios não-condicionados (Thompson e Duganzich, 1996; Poulin *et al.*, 1997). Maeda *et al.* (1996) investigaram o efeito da monocamada de células de granulosa bovina e seu meio condicionado no desenvolvimento de embriões bovinos, e consideraram os meios condicionados menos eficazes que o co-cultivo com células da granulosa, sendo, no entanto, melhor do que os meios não condicionados. Li *et al.* (2004) relatam que o uso de meio condicionado com células do *Cumulus* de bovinos no cultivo de embriões bovinos de transferência nuclear resulta em taxas de mórula e blastocistos superiores ao meio convencional e similares ao sistema de co-cultivo.

Fatores de crescimento como PDGF, LIF, IL-6, IL-1, IL-8, EGF, GH, bFGF, VEGF (Ishiwata *et al.*, 2000) e fatores embriotróficos (Xu *et al.*, 2001) foram detectados em células da granulosa. Isso sugere que elas atuem melhorando o desenvolvimento embrionário e contribuindo para a eliminação parcial ou total de alguns dos problemas do cultivo embrionário como, por exemplo, bloqueio do desenvolvimento e fragmentação.

Os efeitos benéficos das células em sistemas de co-cultivo não parecem ser dependentes do tipo de célula ou tecido das células (Fabbri *et al.*, 2000). No entanto, os diferentes efeitos dos meios condicionados podem ser explicados pelo fato de que as várias células secretam diferentes tipos e quantidades de fatores no meio condicionado. Portanto, meios condicionados, ao contrário dos sistemas de co-cultivo direto, dependem do tipo celular (Malekshah *et al.*, 2006). Malekshah *et al.* (2006) argumentam que, como os resultados de seu estudo mostraram que o poder dos meios condicionados é menor que o co-cultivo direto, pode-se postular que os efeitos benéficos co-cultivo das células da granulosa não são apenas parcialmente relacionados aos fatores solúveis e VEs liberados por estas células no meio de cultivo e que alguns mecanismos adicionais, como o contato célula-célula e a remoção de metabólitos e substâncias potencialmente tóxicas do meio de cultura pelas células cocultivadas estejam envolvidos (Joo *et al.*, 2001).

3.5.5 Oócitos desnudos na maturação *in vitro*

Apesar da importância das células do *Cumulus*, o desnudamento de oócitos é necessário para uma variedade de aplicações, como transferência de vesículas germinativas (Liu *et al.*, 2000), haploidização de células somáticas, criopreservação de oócitos em estágio de vesícula germinativa (Modina *et al.*, 2004) e transferência pronuclear (Xiong *et al.*, 2008). O desnudamento também é necessário para a injeção de RNA ou RNAm de interferência no oócito para ocultar ou super-expressar genes específicos para avaliar seu papel nos processos de MIV ou FIV (Xiong *et al.*, 2008).

Outra aplicação, na medicina humana, é a utilização de oócitos em fase de GV desnudos obtidos após a indução da ovulação para o tratamento por ICSI. Embora esses oócitos sejam de baixa qualidade de desenvolvimento em comparação com suas contrapartes maduras *in vivo* e, portanto, rotineiramente considerados como um produto secundário da FIV, podem ser valiosos para o estudo de novos protocolos de MIV. Além disso, esses oócitos imaturos podem ser resgatados por MIV e podem ser um material excedente para pacientes de ICSI quando um número baixo de oócitos maturados é recuperado (Vanhoutte *et al.*, 2009).

Além disso, aspectos técnicos da recuperação oocitária, como maior fluxo e pressão de aspiração, ou menor diâmetro de agulha, podem resultar no desnudamento total ou parcial do oócito (Bols *et al.*, 1997).

A remoção de CCs no início da MIV ou pouco antes da FIV afeta a maturação subsequente, a fertilização e desenvolvimento embrionário dos oócitos desnudos (Dey *et al.*, 2012). As células do *Cumulus* melhoram a maturação e o potencial de desenvolvimento dos oócitos desnudos (ODs) regulando a atividade do fator de promoção da maturação (MPF), a transição de VC para a metáfase, a distribuição de grânulos corticais (GCs), a montagem do fuso, a distribuição mitocondrial e a exocitose dos GCs (Ge, LI e Sui *et al.*, 2008). Também regulam uma ampla gama de eventos durante a fertilização *in vitro*, incluindo direcionar os espermatozoides em

direção ao oócito, induzindo capacitação e facilitando a reação acrossomal (Fukui, 1990). Mantêm a motilidade e a viabilidade dos espermatozoides (Ijaz *et al.*, 1994), impedem o endurecimento da zona pelúcida (Katska *et al.*, 1989), e aumentam a penetração do espermatozoide e a fertilização (Fukui, 1990). Em bovinos, foram observados resultados variáveis com ODs (Younis e Brackett, 1991; Zhang, Li *et al.*, 1995).

Tendo em vista a baixa competência de desenvolvimento dos oócitos desnudados das células do *Cumulus*, um sistema eficiente de MIV para estes oócitos é urgentemente necessário. No entanto, nenhum desses sistemas foi bem estabelecido em espécies de mamíferos (Ge, L. e Han e *et al.*, 2008).

Muitos estudos relatam que a proporção de oócitos desnudos de mamíferos em estágio de vesícula germinativa que atingem a metáfase MII aumenta quando são cocultivados com células somáticas homogêneas (Ge, L. e Han e *et al.*, 2008; Ge, LI e Sui e *et al.*, 2008) ou heterogêneas (Heng e Chye, 2004; Lee, Ho-joon *et al.*, 2011). Porém, os mecanismos pelos quais as células do *Cumulus* suportam a maturação dos oócitos ainda não são plenamente compreendidos. Embora vários estudos busquem esclarecer o papel específico das células foliculares na maturação dos oócitos por meio do co-cultivo de ODs com células foliculares isoladas ou complexos *Cumulus*-oócitos (CCOs), essas tentativas são ineficazes ou com resultados conflitantes (Ge, L. e Han e *et al.*, 2008). Enquanto Hashimoto, S et al.(1998) relatam que a adição de células do *Cumulus* dispersas no meio de maturação melhora o desenvolvimento dos ODs bovinos, Luciano et al.(2005) afirmam que não a presença das CCs dispersas, mas a presença de CCOs intactos durante a IVM melhora o desenvolvimento dos ODs.

Feng *et al.*(2013) indicam que o co-cultivo de ODs em conglomerados de células do *Cumulus* melhora sua maturação nuclear e citoplasmática, possivelmente por meio de reconstrução de junções *gap in vitro*, porém há relatos conflitantes sobre se as junções *gap* entre as células do *Cumulus* e o oócito são essenciais para o efeito benéfico do co-cultivo na maturação de oócitos. (Ge; Sui; et al., 2008). Zhao *et al.*(2013) relatam que as células do *Cumulus* aumentaram a taxa de metáfase II (MII) de oócitos desnudos e a expressão de certos genes nos oócitos em MII, além de reduzirem o endurecimento da zona pelúcida de oócitos em MII.

Há diferenças funcionais importantes entre células do *Cumulus* (CCs) e células da granulosa mural (CMs); no folículo antral, as CCs circundam o oócito, enquanto as CMs formam a parede folicular (Moor *et al.*, 1980). Os dois tipos de células diferem nas atividades de algumas enzimas (Zoller e Weisz, 1979; Zhong *et al.*, 1989) e em resposta a gonadotrofinas e IGF-I (Magnusson *et al.*, 1982; Khamisi e Roberge, 2001). Em bovinos, o co-cultivo de ODs tanto com CCs (Zhang, LI *et al.*, 1995) como com CMs (Ikeda *et al.*, 2000) melhoram as taxas de blastocistos. No entanto, em camundongos, embora estudos indiquem que o co-cultivo com CCs é benéfico para a maturação nuclear e citoplasmática de ODs (Yamazaki *et al.*, 2001), CMs da mesma espécie não são capazes de melhorar a maturação nuclear (Heng e Chye, 2004).

Ge; Han; *et al.*(2008) indicam que o co-cultivo com monocamada de células do *Cumulus* restaura parcialmente o potencial de desenvolvimento de oócitos desnudos, enquanto restaura completamente a competência de oócitos com apenas a corona-radiata. A maturação em meio condicionado por monocamada de células do *Cumulus* também melhora a maturação dos ODs, mas não tanto quanto no co-cultivo com as CCs. O co-cultivo com monocamada de células da granulosa mural não tem efeito.

Ele sugere que as CCs dos camundongos produzem um (s) fator(es) difusível(s) que suporta a maturação de maneira dependente de *gap*-junctions, e por isso o potencial de desenvolvimento dos ODs é restaurado apenas parcialmente. A produção do fator é afetada por vários fatores, como a densidade e a idade das CCs, a presença de gonadotrofina no meio de maturação e o momento de recuperação dos oócitos após superovulação com eCG. As células murais da granulosa não produziram tal fator no experimento em questão.

O desenvolvimento dos oócitos desnudos) também pode ser melhorado pela presença de CCOs durante a MIV. ODs cocultivados com CCOs na MIV apresentam taxa de blastocisto duas vezes maior que a de ODs cultivados isoladamente; CCOs suprem fatores benéficos para a competência dos ODs (Dey *et al.*, 2012).

Choi *et al.* (2013) relatam que CCOs cocultivados com ODs em proporção 1/5 na maturação *in vitro* apresentaram maior taxa de blastocistos, menor número de células apoptóticas e maior número total de blastômeros que CCOs maturados sem ODs, provavelmente devido a uma maturação nuclear e citoplasmática melhorada pelos OSFs secretados pelos ODs.

Su *et al.* (2004) relatam efeito sinérgico similar no co-cultivo de ODs e COC em clones bovinos. Dey *et al.* (2012) também reportam os efeitos sinérgicos do co-cultivo em diferentes aspectos, como maturação nuclear e citoplasmática, prevenção do endurecimento da ZP, maior taxa de fertilização monospérmica, maior taxa de blastocistos e maior número de células/blastocisto tanto para CCOs como ODs.

Luciano *et al.* (2005) relatam que a restauração do potencial de desenvolvimento dos oócitos desnudos é alcançada apenas quando os ODs são cocultivados com CCOs intactos tanto durante a MIV como a FIV. Sugerem, desta forma, que a interação física entre os oócitos e as células do *Cumulus* não seja essencial durante a MIV e a FIV do oócito desnudo e sim que algum fator difusível produzido pelas células do *Cumulus* e/ou pelo diálogo entre o oócito e as células do *Cumulus* no complexo *Cumulus*-oócito intacto desempenhe um papel chave na aquisição da competência para o desenvolvimento dos oócitos desnudos.

Ainda há um longo caminho para o estabelecimento de um sistema de maturação *in vitro* eficiente para oócitos desnudos (Ge, LI e Sui *et al.*, 2008); as tentativas vêm sendo ineficazes e a competência inicial de desenvolvimento de oócitos desnudos é apenas restaurada de forma limitada (Geshi *et al.*, 2000). Relatos sobre quão essencial é a presença das *gap junctions* entre as células do *Cumulus* e o oócito e sobre a eficiência dos meios condicionados ainda estão em conflito. Estudos futuros são necessários para maior compreensão do papel específico e dos mecanismos de ação dos diferentes tipos celulares que atuam na maturação dos oócitos e para a otimização de protocolos para a MIV dos oócitos desnudos (Ge, L. e Han *et al.*, 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Produção *in vitro* de Embriões do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG, durante o período de janeiro a agosto de 2017. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), sob Protocolo nº. 455 / 2015.

4.1 MATERIAIS E REAGENTES:

Todos reagentes e meios utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA), a menos que especificado.

4.2 COLETA E MANIPULAÇÃO DOS OVÁRIOS

Foram utilizados ovários de vacas abatidas em dois abatedouros localizados nas cidades de Belo Horizonte MG e Betim/MG, situados a aproximadamente 20 minutos e 40 minutos, respectivamente, do laboratório de produção *in vitro* onde os ovários foram processados. A coleta ocorreu durante o período de janeiro a julho de 2017. Os ovários foram coletados imediatamente após a evisceração dos animais, imersos em solução fisiológica (NaCl a 0,9%) e acondicionados em garrafa térmica com temperatura entre 33-36° C. Neste recipiente, em intervalo de até 4 horas pós-abate, os ovários foram transportados para o laboratório, onde foram devidamente processados. Foram coletados 1890 ovários durante o período do experimento.

4.3 RECUPERAÇÃO DOS OÓCITOS

No laboratório os oócitos foram aspirados de folículos entre 2 e 8 mm de diâmetro, com seringas de 3 mL acopladas a agulhas de 40x12mm. O fluido folicular aspirado foi depositado em tubos Falcon de 50 mL em banho-maria à temperatura de 36°C. Após o preenchimento de cada tubo Falcon, dez minutos foram aguardados para decantação dos complexos *Cumulus*-oócitos; o excesso de líquido folicular foi descartado e o conteúdo do tubo foi transferido para placa de Petri 100 x 20 mm mantida em placa aquecedora, em temperatura de 38°C. Os complexos *Cumulus*-oócitos (CCOs) foram rastreados com auxílio de estereomicroscópio e depositados em placa de cultivo celular contendo meio de lavagem de oócitos aquecido a 38°C.

Apenas oócitos bovinos classificados como Grau I (*Cumulus-oophorus* compacto, mais de três camadas de células e citoplasma homogêneo) e Grau II (*Cumulus-oophorus* compacto com três ou menos camadas de células do *Cumulus* e citoplasma levemente heterogêneo) foram selecionados (Sutton, M. L. *et al.*, 2003). Foram selecionados, ao longo das coletas, 2927 oócitos, dos quais 1402 foram desnudados.

1525 CCOs e 1402 oócitos desnudados foram maturados *in vitro*, e aproximadamente dois terços destes oócitos foram fertilizados subsequentemente para avaliação do potencial de desenvolvimento embrionário. As células do *Cumulus* obtidas dos 1402 oócitos desnudados foram utilizadas para produção do meio condicionado.

4.4 DESNUDAMENTO DOS OÓCITOS

Os oócitos foram desnudados em placa de Nunc com 800 microlitros de meio (TCM-199 Hepes (Gibco, EUA) suplementado com 10% de SFB, 22µg/mL Piruvato e 83

µg/mL de amicacina (Nova Farma®), por meio de pipetagens sucessivas com pipeta regulada para volume de 400 µL.

4.5 PREPARO DO MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS DO *CUMULUS*

4.5.1 Cultivo em monocamada das células do *Cumulus*:

CCOs em estágio de vesícula germinativa, obtidos de ovários de abatedouro conforme descrito previamente, foram desnudados conforme descrito acima.

Os oócitos foram removidos do meio e a concentração das células do *Cumulus* foi determinada pelo método do Azul de Trypan. Uma amostra de 90 µl da suspensão celular foi diluída em 10 µl de solução de Azul de Trypan 0,4% e analisada em câmara de Neubauer. As células mortas apresentam-se coradas pelo Azul de Trypan e as células vivas permanecem não coradas, com aspecto refringente em microscópio óptico (Fig. 7).



Figura 7 – Células do *Cumulus* de bovino durante contagem em câmara de Neubauer. Células vivas (seta) e célula não viável corada em azul (asterisco). Coloração: azul de Trypan. Microscópio Óptico Comum, aumento 200X.

As células foram plaqueadas na concentração de 2 a 3 x 10⁵ células viáveis/mL em placas de Nunc de 4 poços (800 µL de suspensão/ poço). O cultivo foi feito em meio TCM-199 Hepes (Gibco, EUA) suplementado com 10% de SFB, 22µg/mL piruvato e 83 µg/mL de amicacina em incubadora a 37°C com 5% Co₂ e 95% de umidade.

4.5.2 Condicionamento do meio

No momento em que as células do *Cumulus* cultivadas atingiram 80% de confluência o meio de cultivo foi substituído por meio base de maturação de oócitos previamente estabilizado em incubadora por 2 horas (TCM-199 bicarbonato (Gibco®), suplementado com 10% de SFB, 22µg/mL piruvato, 83 µg/mL de amicacina (Nova Farma®), 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin®, Bioniche) e 5 UI/mL de LH (Chorulon®, MSD Saúde Animal) e 1 µg/mL de estradiol). Após um período de 14 horas o meio condicionado (MC) foi aspirado dos poços e centrifugado a 231 G por 10 minutos para a remoção de células e debris, e em seguida congelado a -80°C.

Os primeiros meios condicionados foram obtidos a partir de ovários coletados exclusivamente para este propósito; posteriormente, passaram a ser preparados, em

cada ciclo de maturação realizado, com as células do *Cumulus* removidas dos CCOs durante o procedimento padrão de desnudamento de parte dos oócitos selecionados; estes meios condicionados eram utilizados nos ciclos subsequentes de maturação.

Foram produzidas e utilizadas 23 partidas de meios condicionados, com volume variável segundo a quantidade de células do *Cumulus* obtida no dia do preparo. Foram necessários aproximadamente 150 oócitos graus I e II (3 a 4×10^5 células totais) para a obtenção de células para o condicionamento de 800 µl de meio (um poço), quantidade média produzida por rotina (concentração de plaqueamento 3×10^5 células viáveis/mL ou $2,4 \times 10^5$ células viáveis por poço. Todos as partidas de meios condicionados foram obtidas com base no mesmo protocolo, porém a partir de pools de oócitos diferentes, que incluem ovários com folículos de tamanhos variados, de vacas de diferentes raças e escores de condição corporal, em diferentes momentos do ciclo estral, gestantes ou não. Foram desnudados, no total, em torno de 3.400 oócitos para a obtenção das células do *Cumulus* cultivadas

4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a maturação *in vitro*, os CCOs e os oócitos desnudos foram distribuídos em 4 tratamentos, conforme o meio de maturação utilizado e o tipo de oócito; 2 gotas por tratamento, em um total de 8 gotas por placa e de 20 a 25 oócitos por gota (Fig.8). Em cada rotina de maturação eram maturados de 160 a 200 oócitos. Foram feitas 24 rotinas de maturação, com um total de 2927 oócitos (1525 CCOs e 1402 desnudos) distribuídos nos 4 tratamentos.

1. Grupo controle CCOs: Complexos *Cumulus*-oócito (CCOs) em meio de maturação base (TCM-199 bicarbonato (Gibco®), suplementado com 10% de SFB, 22µg/mL Piruvato, 83 µg/mL de amicacina (Nova Farma®), 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin®, Bioniche) e 5 UI/mL de LH (Chorulon®, MSD Saúde Animal) e 1 µg/mL de estradiol). 767 CCOs maturados.
2. Grupo controle desnudos: Oócitos desnudos em meio de maturação base (TCM-199 bicarbonato (Gibco®), suplementado com 10% de SFB, 22µg/mL Piruvato, 83 µg/mL de amicacina (Nova Farma®), 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin®, Bioniche) e 5 UI/mL de LH (Chorulon®, MSD Saúde Animal) e 1 µg/mL de estradiol). 700 oócitos desnudos maturados.
3. Grupo meio condicionado CCOs: Complexos *Cumulus*-oócito (CCOs) em meio condicionado por células do *Cumulus oophorus*, previamente descongelado e equilibrado em incubadora por um período de 2 horas. 758 CCOs maturados.
4. Grupo meio condicionado desnudos: Oócitos desnudos em meio condicionado por células do *Cumulus oophorus*, previamente descongelado e equilibrado em incubadora por um período de 2 horas. 702 oócitos desnudos maturados.

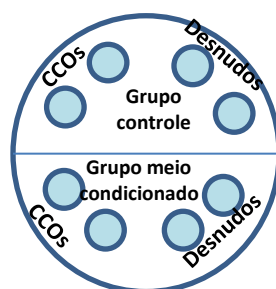
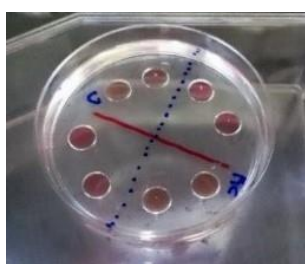


Figura 8. Foto e esquema do delineamento experimental, ilustrando os 4 tratamentos aplicados durante a maturação *in vitro* dos CCOs e oócitos desnudos

4.7 MATURAÇÃO *IN VITRO*

Os CCOs e oócitos desnudos a serem distribuídos nos 4 tratamentos, segundo o delineamento experimental, foram lavados duas vezes em meio TCM-199 Hepes (Gibco, EUA) suplementado com 10% de SFB, 22µg/mL piruvato e 83 µg/mL de amicacina e em seguida 3 vezes em meio de maturação base (TCM-199 Bicarbonato (Gibco®11150059), suplementado com 10% de SFB, 22 µg/mL piruvato, 83 µg/mL de amicacina (Nova Farma®), 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin®, Bioniche), 5 UI/mL de LH (Chorulon®, MSD Saúde Animal) e 1 µg/mL de estradiol).

A maturação nos 4 tratamentos foi realizada em gotas de 90 µL, sob óleo mineral, temperatura de 38,5°C, atmosfera gasosa controlada de 5% CO₂, umidade de aproximadamente 95% por um período médio de 24 horas.

Após cada ciclo de MIV realizado, aproximadamente um terço dos oócitos foi utilizada para a avaliação da maturação e dois terços para a avaliação do potencial de desenvolvimento embrionário. Em síntese:

2927 oócitos maturados (1525 CCOs e 1402 desnudos), dos quais:

- 894 oócitos (436 CCOs e 458 desnudos) maturados em 11 rotinas e avaliados quanto à maturação nuclear e citoplasmática (472 oócitos), resistência à digestão enzimática da zona pelúcida (342 oócitos) e ultraestrutura oocitária em microscopia eletrônica de transmissão (80 oócitos).
- 2033 oócitos (1089 CCOs e 944 desnudos) maturados e submetidos à fertilização *in vitro* e cultivo embrionário (13 rotinas) e avaliados quanto ao potencial de desenvolvimento embrionário.
- Adicionalmente, foi avaliada a expansão das células do *Cumulus* de todos os CCOs maturados em meio controle e meio condicionado (1525 CCOs).

4.7 FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

Uma palheta de sêmen bovino convencional não sexado (sempre do mesmo touro) foi descongelada à 37°C por 30 segundos. Os espermatozoides viáveis foram obtidos por centrifugação a 750 rpm por 5 minutos em gradiente Percoll (2mL 45% Percoll + 2mL de 90% Percoll) e o pellet obtido foi posteriormente lavado em meio de lavagem TL-Sêmen. A fecundação (considerada dia 0; D0) foi realizada em gota de 90 µL em meio Tyrode's-albumina-lactato-piruvato (TALP) suplementado com 83 µg/mL de amicacina, 44 µL/mL de solução PHE, 0,6% de albumina sérica bovina (BSA), 0,2mM de piruvato de sódio e 10 µg/mL de heparina. Os espermatozoides foram adicionados às gotas de FIV em uma concentração final de 1x10⁶ espermatozoides /mL. As gotas foram cobertas com óleo mineral e incubadas sob as mesmas condições da MIV por um período de 18 a 20 horas.

4.8 CULTIVO EMBRIONÁRIO *IN VITRO*

Ao término da FIV, os prováveis zigotos foram submetidos ao procedimento de desnudamento mecânico por meio de pipetagens consecutivas para retirada das células do *Cumulus* e, em seguida, lavados e transferidos para o cultivo *in vitro* (CIV). O cultivo foi feito em gotas de 90 µL constituídas de meio sintético de fluido de oviduto (SOF) suplementado com 0,2 mM de piruvato de sódio, 83 µg/mL de amicacina, 0,5% BSA livre de ácido graxo fração V e 2,5% de SFB sob óleo mineral.

O cultivo foi realizado à temperatura de 38,5°C sob baixa tensão de oxigênio (5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂). Os embriões permaneceram no cultivo por 8 dias.

4.9 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

A taxa de clivagem e a taxa de blastocistos foram avaliadas para 1089 supostos zigotos de CCOS e 944 supostos zigotos de oócitos desnudos.

Para determinação da taxa de clivagem os embriões de todos tratamentos foram avaliados 48 (D2) a 72 (D3) horas pós inseminação (hpi) sob microscópio estereoscópio (aumento de 40x). Neste momento foi feito o procedimento de *feeding*, em que aproximadamente 40% do volume da gota (30µL) foi substituído por meio novo. A taxa de blastocisto foi observada 168hpi (D7).

4.10 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO *IN VITRO*

Para avaliação da maturação oocitária, os parâmetros analisados foram a maturação nuclear (configuração cromossômica), a maturação citoplasmática (padrão de distribuição mitocondrial), a resistência à digestão enzimática da zona pelúcida (tempo de digestão) e a ultraestrutura oocitária em microscopia eletrônica de transmissão dos CCOS e dos oócitos desnudos, e a taxa de expansão das células do *Cumulus* dos CCOS.

4.10.1 Maturação nuclear e citoplasmática

472 oócitos (231 CCOS e 241 desnudos) e 30 oócitos não maturados (controle imaturo), foram submetidos ao processo de coloração para determinação da maturação nuclear e citoplasmática, de acordo com a metodologia proposta por JESETA *et al.* (2014). Foi utilizado o corante fluorescente Mitotracker Orange para avaliação da maturação citoplasmática e Hoechst 33342 para avaliação da maturação nuclear.

Os oócitos foram incubados por 30 minutos à 38,5°C a 5% CO₂ com phosphate buffered saline (PBS) suplementado com 4% BSA e 280nM Mitotracker Orange (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), para coloração apenas das mitocôndrias fisiologicamente ativas. Após a lavagem os CCOS permaneceram 5 minutos em uma solução aquecida de hialuronidase 1% para auxiliar na remoção das células do *Cumulus*, e em seguida foram desnudados por pipetagens consecutivas. Após lavagem em PBS sem BSA os oócitos foram fixados em formaldeído 3,7%, por 60 minutos, em ambiente sem luz, em temperatura ambiente. Após a fixação, foram realizadas lavagens consecutivas e os oócitos foram colocados sobre lâmina, onde se adicionou uma gota de Hoechst 33342 de trabalho em glicerol 90%, para marcar a configuração cromossômica determinante da maturação nuclear. As lâminas foram armazenadas no escuro a 4°C até a leitura.

Para avaliação da maturação nuclear avaliou-se a configuração da cromatina sob microscópio de epifluorescência (EVOS® FL Cell Imaging System, Life Technologies), com filtro de excitação de 365nm e de emissão de 420 nm. Os oócitos foram classificados em Vesícula Germinativa (VG), Metáfase I (MI) e Metáfase II (MII) (Fig.9) seguindo os critérios adotados por Santos, S. *et al.* (2002). Foram considerados maturados os oócitos em metáfase II.

- Vesícula Germinativa (VG): núcleo vesicular e cromossomos pouco ou não condensados;

- Metáfase I (MI) –Grau avançado de condensação cromossômica
- Metáfase II (MII) - grupo denso de cromossomos formando o primeiro corpúsculo polar e outro grupo mais afastado correspondente à placa metafisária;
- Não definido (ND) OU Degenerados (Deg) –não é possível a visualização da fase da meiose devido a presença de células do *Cumulus* e/ ou vacúolos/ artefatos.;



Figura 9. Esquema da configuração da cromatina em oócitos em estágio de VG, MI e MII. Fonte: <http://www.notapositiva.com/old/pt/apntestbs/biologia/imagens/?MA>.

A determinação da atividade mitocondrial foi feita em microscópio confocal LSM 510 Meta (ZEISS) (Setor de Microscopia Confocal da Universidade Federal de Uberlândia), com onda emissão de 543nm e onda de excitação de 585 a 649nm. Considerou-se como padrão imaturo o padrão de distribuição mitocondrial homogêneo, com mitocôndrias de baixa fluorescência dispersas difusamente, sem a presença de clusters; e o padrão heterogêneo, de alta fluorescência (denotando alta atividade mitocondrial), com mitocôndrias em clusters, sejam estes periféricos, perinucleares ou periféricos/ perinucleares, distribuídos heterogeneamente pelo citoplasma, foi associado a oócitos maturados, similar ao padrão descrito por AMBRUOSI *et al.*(2009). As imagens foram avaliadas e processadas utilizando o software Zeiss LSM Image Browser Version 4.2.0.121.

4.10.2 Tempo de digestão enzimática da zona pelúcida

A resistência à digestão enzimática da ZP foi avaliada em 342 oócitos maturados (165 CCOs e 177 oócitos desnudos) + um controle negativo de 37 oócitos imaturos. Mediu-se o tempo de digestão da ZP a duas enzimas diferentes:

- pronase a 0,5% (P8811 SIGMA- Protease de *Streptomyces griseus*): 112 CCOs, 123 desnudos (Fig. 13)
- quimotripsina a 1% (P6267 SIGMA - α -quimotripsina de pâncreas bovino): 53 CCOs, 54 desnudos.

Quimotripsina: após a MIV, os CCOs foram desnudados mecanicamente em solução aquecida de hialuronidase 1%. Em seguida, grupos de CCOs e oócitos desnudos dos grupos controle e meio condicionado foram incubados, separadamente, em solução de quimotripsina dissolvida a 1,0% em solução fisiológica fosfato-tamponada, com albumina sérica bovina, em plataforma aquecida (37°C), na proporção de 3 mL/ oócito. A integridade da zona pelúcida foi monitorada continuamente em estereomicroscópio em aumento de 75 vezes. O tempo de digestão da zona pelúcida considerado para cada oócito foi o tempo entre a colocação das amostras na solução de pronase e o momento em que os limites da zona pelúcida deixaram de estar visíveis (Matson *et al.*, 1997)

Pronase: Após a MIV, os CCOs foram desnudados mecanicamente em solução aquecida de hialuronidase 1%. Em seguida, grupos de CCOs e oócitos desnudos dos grupos controle e meio condicionado foram incubados, separadamente, em solução de

pronase dissolvida a 05% em solução fisiológica fosfato-tamponada, com PVP, em plataforma aquecida (37°C), na proporção de 3 mL/ oócito. A integridade da zona pelúcida foi monitorada continuamente em estereomicroscópio em aumento de 75 vezes. O tempo de digestão da zona pelúcida considerado para cada oócito foi o tempo entre a colocação das amostras na solução de pronase e o momento em que os limites da zona pelúcida deixaram de estar visíveis (Coy e Grullon *et al.*, 2008).

4.10.3 Ultraestrutura oocitária por microscopia eletrônica de transmissão:

80 oócitos maturados (20 de cada tratamento), além de um controle negativo constituído por 20 oócitos imaturos, foram processados para análise por microscopia eletrônica de transmissão.

Os oócitos foram fixados em fixador de Karnovsky modificado (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2%) por 24 horas, em temperatura de 4-8°C, e em seguida transferidos para tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2-7,4 por um mínimo de 24 horas, em temperatura de 4-8°C. Foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e CaCl₂ 5mM em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2. Em seguida os oócitos foram contrastados com acetato de uranila 0,5%, desidratados em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) e emblocados em resina epóxi Spurr. Secções semifinas foram coradas com azul de toluidina e examinadas em microscópio óptico. Secções ultrafinas (70nm) foram contrastadas com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo 1%. As observações ultraestruturais foram feitas com o Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI - 120 kV (Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG).

A avaliação da maturação foi feita de acordo com KRUIP *et al.* (1983) sendo consideradas características de maturação um espaço perivitelínico (Pv) bem desenvolvido, microvilosidades eretas, mitocôndrias em conglomerados (clusters) próximas a gotas lipídicas, grânulos corticais alinhados à membrana plasmática e retículo endoplasmático liso em regiões corticais e em clusters pelo citoplasma. As características de não-maturação foram espaço perivitelínico pequeno, microvilosidades deitadas, mitocôndrias não associadas a gotas lipídicas, grande quantidade de vesículas dispersas pelo citoplasma e a presença de grumos de grânulos corticais não alinhados.

4.10.4 Expansão das células do Cumulus (avaliada apenas para os grupos de CCOs)

Foram avaliados 1525 complexos Cumulus-oócitos quanto à expansão das células do cumulus, ao longo de 24 rotinas. Após maturação oocitária *in vitro*, cada oócito individualmente foi avaliado sob estereomicroscópio quanto ao grau de expansão das células do cumulus, classificado e quantificado em 2 categorias: expandido: expansão total ou expansão parcial das células do cumulus; não-expandido: ausência de expansão do cumulus.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Shapiro Wilk foi usado para avaliar a normalidade das variáveis contínuas: taxa de digestão da zona pelúcida, taxa de expansão do Cumulus, taxa de clivagem, taxa de blastocisto. As variáveis normais, as variáveis que atenderam às premissas de normalidade após a transformação e as variáveis contínuas em relação aos diferentes tratamentos foram analisadas pelo teste ANOVA. O teste de qui-quadrado ou exato

de Fischer foi utilizado para avaliar a associação das variáveis qualitativas (maturação nuclear e citoplasmática) em relação aos tratamentos. Estas análises foram realizadas com o programa SAS® versão 9.0. A taxa de expansão não atendeu às premissas de normalidade e foi avaliada pelo teste não paramétrico de Friedman, com o uso do programa InfoStat versão 2016. O nível de significância considerado foi de $p = 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 O MEIO CONDICIONADO:

Foram produzidas 23 partidas do meio condicionado, utilizadas de forma aleatória para a maturação dos oócitos. O tempo médio de obtenção da confluência de 80% na placa (Fig. 10), critério para determinar o momento de substituição do meio de crescimento para o meio a ser condicionado, foi de 44 ± 14 horas.

A proporção de células viáveis/ inviáveis plaqueadas, verificadas por meio da coloração com azul de Trypan em câmara de Neubauer, variou de 50 a 90%; o número de células do *Cumulus* totais viáveis permaneceu sempre em torno de $2,4 \times 10^5$.

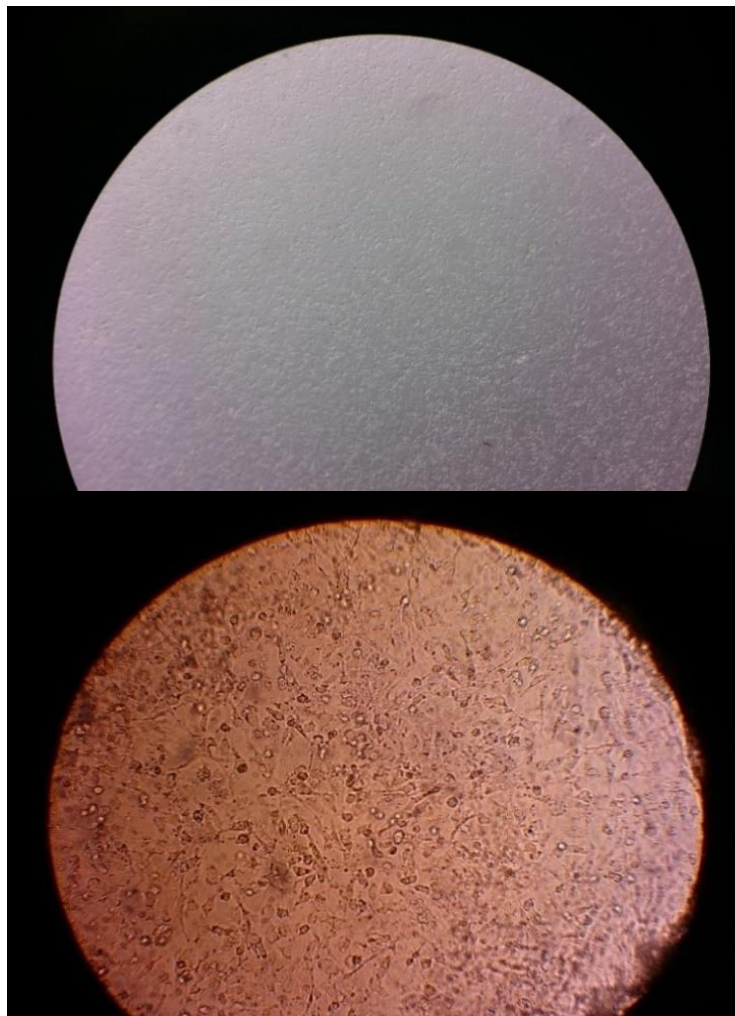


Figura 10- Cultivo de células do *Cumulus* em monocamada, com 80% de confluência

5.2 AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO *IN VITRO*:

Quatrocentos e setenta e dois oócitos (231 CCOs, 241 desnudos) foram processados para avaliação da maturação nuclear e citoplasmática. Em 96 oócitos (65 CCOs e 31 desnudos) não foi possível identificar a fase da meiose devido à presença de células do *Cumulus* (falha do processo de desnudamento) ou devido à degeneração e/ ou vacuolização que impediram a visualização dos cromossomos. Trezentos e setenta e seis oócitos (166 CCOs e 210 desnudos), foram avaliados quanto à maturação nuclear com coloração Hoescht. Destes, 226 tiveram a maturação citoplasmática também avaliada, estabelecendo-se uma correlação, para cada um deles, do estágio de maturação nuclear e citoplasmática simultaneamente.

5.2.1 Maturação nuclear:

Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os CCOs e os oócitos desnudos que atingiram a maturação nuclear (estágio de metáfase II com a emissão do primeiro corpo polar) e o meio condicionado não influenciou a taxa de oócitos bovinos que concluíram a maturação nuclear. 80.05% do número total de oócitos apresentou-se em metáfase II após 24 horas de maturação (Tab. 1).

Tabela 1: Estágio de maturação nuclear de complexos *Cumulus*-oócito e oócitos desnudos bovinos maturados em meio controle e meio condicionado

Tipo de oócito	Meio de MIV	Número de oócitos	Maturados
CCO	Controle	84	80,95%
	Condicionado	82	85,37%
Total CCOs		166	83,13%
Desnudo	Controle	101	77,23%
	Condicionado	109	77,98%
Total desnudos		210	77,62%
Total oócitos		376	80,05%

Letras diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

Três configurações de cromatina foram identificadas: VG, MI e MII (Tab.2) (Fig. 11).

Tabela 2. Configuração da cromatina de complexos *Cumulus*-oócito e oócitos desnudos bovinos maturados em meio controle e meio condicionado

Tipo de oócito	Meio de MIV	Número de oócitos	VG	MI	MI
CCO	Controle	84	3,57%	15,48%	80,95%
	Condicionado	82	2,44%	12,20%	85,37%
Total CCO		166	3,61 %	13,25%	83,13%
Desnudos	Controle	101	3,96%	18,81%	77,23%
	Condicionado	109	3,67%	18,35%	77,98%
Total Desnudos		210	3,81%	18,57%	77,62%
Total oócitos		376	3,72%	16,22%	80,05%

Letras diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

A interrupção da retomada da meiose em MI ocorreu em 13,25 % dos CCOS e 18,57% dos oócitos desnudos, diferença não significativa.

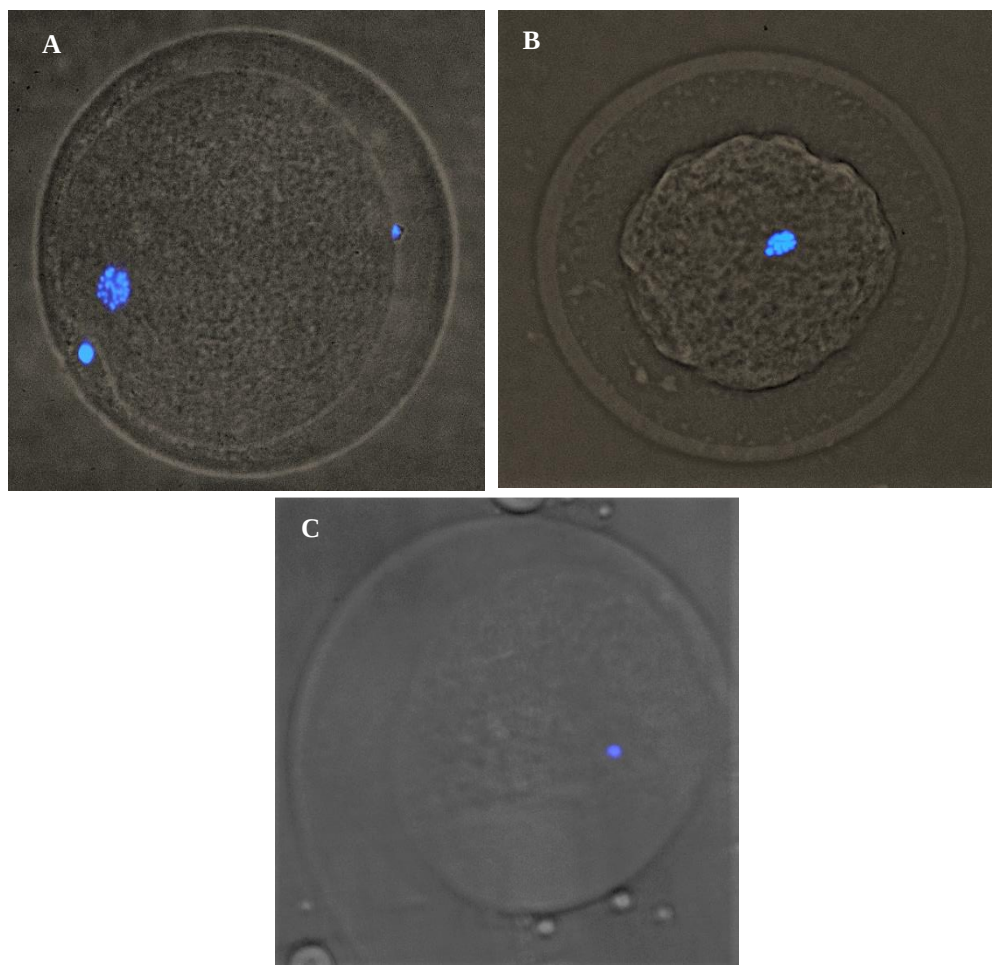


Figura 11. Microscopia de fluorescência apresentando CCO em metáfase II (A), oócito desnudo em metáfase I (B) e CCO em VG (C).

5.2.2 Maturação citoplasmática

Duzentos e vinte e seis oócitos tiveram sua configuração mitocondrial avaliada (Fig.12, 13 e 14). Destes, em torno de 14% não puderam ser avaliados por algum tipo de degeneração durante o processamento.

A porcentagem de oócitos que alcançaram a maturação citoplasmática não diferiu entre CCOs e oócitos desnudos, independentemente do meio de maturação, e nem diferiu, intra-grupos, na comparação entre meio controle e meio condicionado. Considerando a média de todos os oócitos, a maturação citoplasmática foi alcançada em 42,9% dos oócitos (Tab.3). A maturação citoplasmática dos CCOs em meio condicionado não foi significativamente diferente da dos CCOs em meio controle, bem como a maturação citoplasmática dos oócitos desnudos em meio condicionado não foi significativamente diferente da dos oócitos desnudos em meio controle (Tab. 3).

Tabela 3. Maturação citoplasmática de CCOs e oócitos desnudos bovinos maturados em meio controle e meio condicionado

Tipo de oócito	Meio de MIV	Número de oócitos	Maturados (padrão heterogêneo)
CCO	Controle	68	38,23%
	Condicionado	50	50%
	Total CCOs	118	43,22%
Desnudo	Controle	48	35,42%
	Condicionado	60	48,33%
	Total desnudos	108	42,59%
Total oócitos		226	42,92% (96)

Letras minúsculas diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

A maturação citoplasmática dos oócitos (CCOs + desnudos) no meio condicionado (49,09%) não foi significativamente diferente da dos oócitos maturados no meio controle (37,07%) (Tab.4).

Tabela 4. Maturação citoplasmática de oócitos bovinos maturados em meio controle e meio condicionado

	Meio controle	Meio condicionado
Maturados	37,07% (43)	49,09% (54)
Não maturados	62,93% (73)	50,91% (56)

Letras minúsculas diferentes entre si na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

O padrão heterogêneo de distribuição mitocondrial (maturado) foi classificado em periférico, perinuclear ou periférico/ perinuclear (Tab.5); houve diferenças significativas entre os padrões encontrados. Na comparação entre CCOs e oócitos desnudos maturados em meio condicionado, os CCOs apresentam padrão perinuclear predominante (68%) e os oócitos desnudos, padrão periférico predominante (48,27%). Considerando-se apenas o tratamento controle, os desnudos apresentam maior proporção de distribuição periférica (58,82%) que os CCOs (30,76%), que apresentam distribuição periférica-perinuclear predominante (Tab.5). E, na comparação entre CCOs e desnudos, independentemente do meio de maturação, verifica-se que o padrão predominante nos desnudos é o padrão periférico, enquanto nos CCOs o padrão predominante é o perinuclear (Tab.6).

Tabela 5: Padrão de distribuição mitocondrial de complexos *Cumulus* oócito e oócitos desnudos bovinos com maturação citoplasmática, em meio controle e meio condicionado

Tipo oócito	Tratamento	Het.	Het. perinuclear	Het. per-pn
		periférica		
CCO	Controle	30,76% A	46,15%	23,08
	MC	24% a	68%	8%
Desnudo	Controle	58,82% B	41,18%	0
	MC	48,27% b	34,48% b	17,24%
Total oócitos		39,17%	47,42%	13,40%

Letras minúsculas diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

Letras maiúsculas diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

Tabela 6: Padrão de distribuição mitocondrial de complexos *Cumulus* oócito e oócitos desnudos bovinos com maturação citoplasmática, independente do meio de maturação.

Tipo oócito	Het. periférica	Het. perinuclear	Het. per-pn
Total CCOs	27,45% a	56,86%	15,69%
Total desnudo	52,17% b	36,96%	10,87%

Letras minúsculas diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

Duzentos e dezessete oócitos tiveram maturação nuclear e citoplasmática avaliadas simultaneamente (Tab.7); destes, apenas 39,63% apresentaram maturação nuclear e citoplasmática. Não houve diferenças significativas nas comparações entre CCOs e oócitos desnudos, nem nas comparações entre oócitos maturados no meio controle e no meio condicionado. Dos 217 oócitos, 4,61% apresentaram maturação citoplasmática (mitocôndrias ativadas e em clusters), porém com oócito em MI.

Tabela 7. Maturação nuclear e citoplasmática avaliada simultaneamente com Hoescht e Mitotracker em complexos *Cumulus*-oócito e oócitos desnudos bovinos maturados em meio controle e meio condicionado

Tipo do oócito	Meio de maturação	Total oócitos	Só Mat. Nuc.	Mat.nuc. + Mat.citopl.	Só Mat. Citopl.	Sem mat.nuc e sem mat.citopl.
CCO	Controle	67	46,27%	37,31%	1,49%	14,93%
	MC	46	36,96%	50,00%	4,35%	8,70%
Total CCOs		113	42,48%	42,48%	2,65%	12,39%
Desnudo	Controle	45	42,22%	31,11%	4,44%	22,22%
	MC	59	35,59%	40,68%	8,47%	15,25%
Total desnudos		104	38,46%	36,54%	6,73%	18,27%
Total geral		217	40,55%	39,63%	4,61%	15,21%

Letras minúsculas diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

Total oócitos: número total de oócitos com maturação nuclear e citoplasmática avaliada simultaneamente

Só Mat Nuc: oócitos com maturação nuclear, porém sem maturação citoplasmática

Mat.nuc. + Mat.citopl.: oócitos com maturação nuclear e maturação citoplasmática

Só Mat Citopl.: oócitos com maturação citoplasmática, porém sem maturação nuclear

Sem mat.nuc e sem mat.citopl.: oócitos sem maturação nuclear e sem maturação citoplasmática

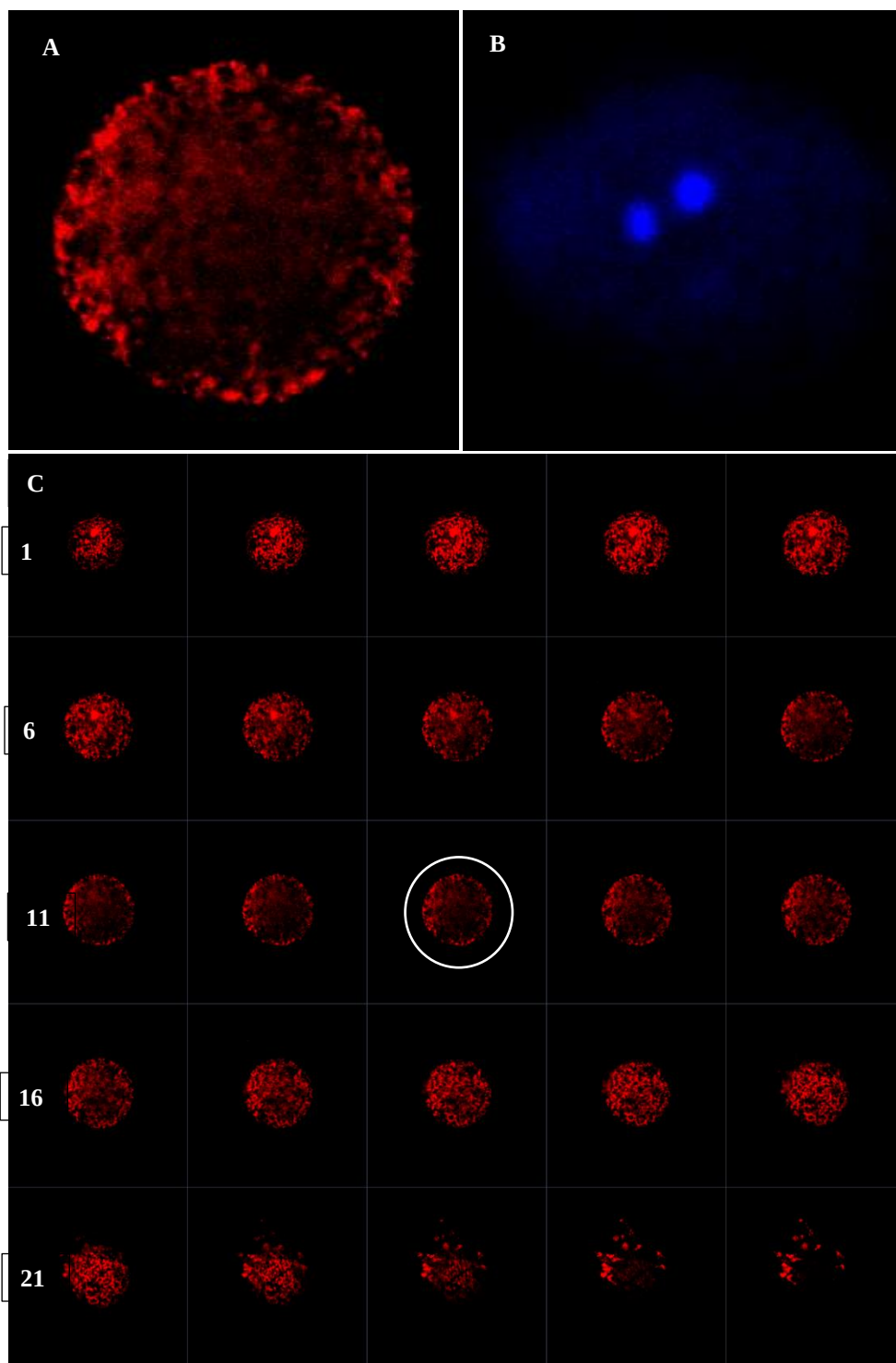


Figura 12. Imagens de microscopia confocal e de fluorescência do mesmo oócito (desnudo, meio controle) mostrando o padrão de distribuição citoplasmática das mitocôndrias marcadas com Mitotracker Orange CMTM Ros e a configuração cromossômica marcada com HOESCHT.

(A) Mat.citoplasm.: distribuição mitocondrial heterogênea periférica, oócito maturado - plano equatorial

(B) Maturação nuclear.: oócito em metáfase II

(C) Padrão periférico de distribuição mitocondrial em 25 cortes ópticos seriados. Esta amostra representa o estudo confocal realizado em todos os oócitos examinados. O corte com o círculo branco representa o plano equatorial. Nos cortes inferiores (1 a 5) e superiores (21 a 25) do oócito, a marcação mostra clusters

de mitocôndrias, representando os focos subplasmalema, enquanto nos planos próximos à posição equatorial (6 a 19) vê-se a agregação periférica das mitocôndrias

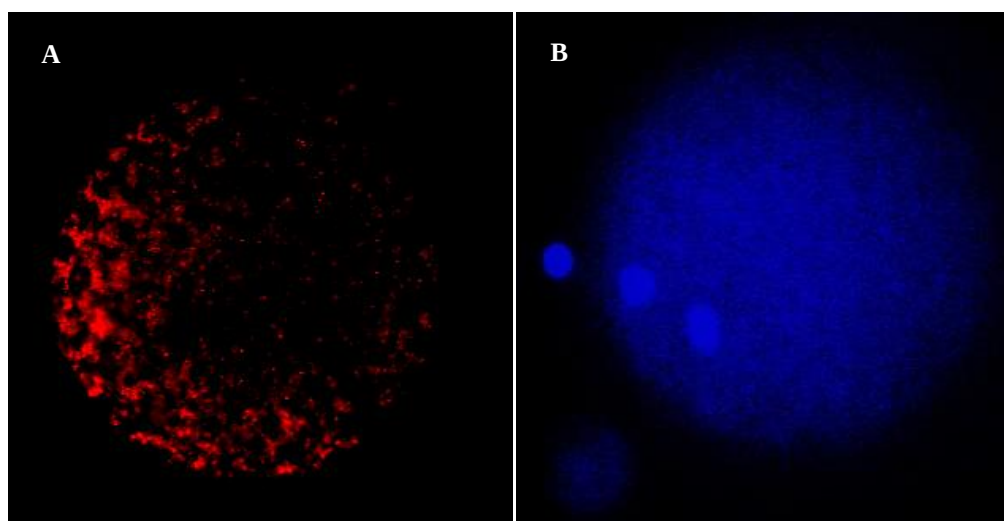


Figura 13. Imagens de microscopia confocal e de fluorescência do mesmo oócito (desnudo, meio condicionado) mostrando padrão de distribuição citoplasmática perinuclear das mitocôndrias marcadas com o Mitotracker Orange CMTM Ros e configuração cromossômica com HOESCHT.

(A) Matur. Citoplasm.: distribuição mitocondrial perinuclear em oócito maturado - plano equatorial
(B) Matur. Nuclear.: Oócito em metáfase II

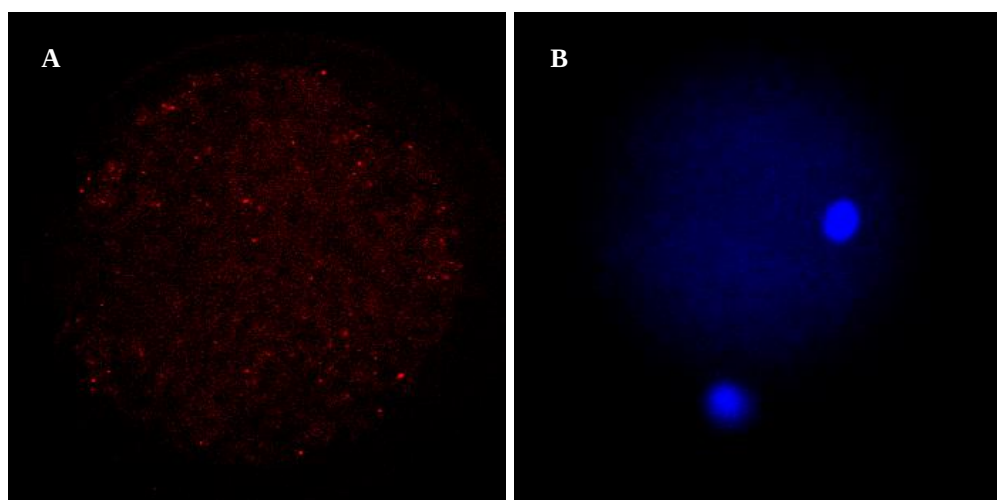


Figura 14. Imagens de microscopia confocal e de fluorescência do mesmo oócito (CCO, meio controle) mostrando o padrão de distribuição citoplasmática das mitocôndrias marcadas com o Mitotracker Orange CMTM Ros e configuração cromossômica com Hoescht.

(A) Matur. Citoplasm.: Padrão de distribuição mitocondrial HOMOGÊNEO em oócito com imaturidade citoplasmática - plano equatorial
(B) Matur. Nuclear.: Oócito em metáfase II – maturação nuclear completa

5.2.3 Tempo de digestão enzimática da zona pelúcida

No ensaio de digestão usando a quimotripsina a 1%, o tempo médio de digestão da ZP para os oócitos desnudos maturados no meio condicionado (12,71 minutos) foi significativamente menor ($p=0,001$) que o dos oócitos desnudos maturados no meio controle (15,95 minutos) (Tab. 8).

Houve diferença significativa entre o tempo médio de digestão de CCOs (77,48 min.) e o tempo médio de digestão dos oócitos desnudos (14,33 min.) (Tab. 8).

Tabela 8. Tempos de digestão enzimática em minutos da zona pelúcida de CCOs e oócitos desnudos bovinos à quimotripsina 1%

Tipo de oócito	Meio de MIV	Número de oócitos	Tempo de digestão da ZP
	Controle	26	78,21 ± 10,51 a
CCO	Condicionado	27	76,78 ± 10,20 a
Total CCOs		53	77,48 a
	Controle	27	15,95 ± 3,24 b
Desnudo	Condicionado	27	12,71 ± 2,29 c
Total desnudos		54	14,33 bc

Letras minúsculas diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ($p<0,05$)

No ensaio de digestão usando a pronase a 0,5% (Tab.9 e Fig.15) não houve diferença significativa entre os oócitos maturados em meio controle e meio condicionado, bem como não houve diferença significativa entre o tempo médio de digestão da ZP dos CCOs (10,54 minutos) e dos oócitos desnudos (10,28 minutos).

Tabela 9. Tempos de digestão enzimática em minutos da zona pelúcida de CCOs e oócitos desnudos bovinos à pronase 0,5%

Tipo de oócito	Meio de MIV	Número de oócitos	Tempo de digestão da ZP
	Controle	53	11,52 ± 9,31
CCO	Condicionado	59	9,65 ± 4,36
Total CCOs		112	10,54
	Controle	63	9,75 ± 5,58
Desnudo	Condicionado	60	10,83 ± 5,65
Total desnudos		123	10,28

Letras minúsculas diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ($p<0,05$)

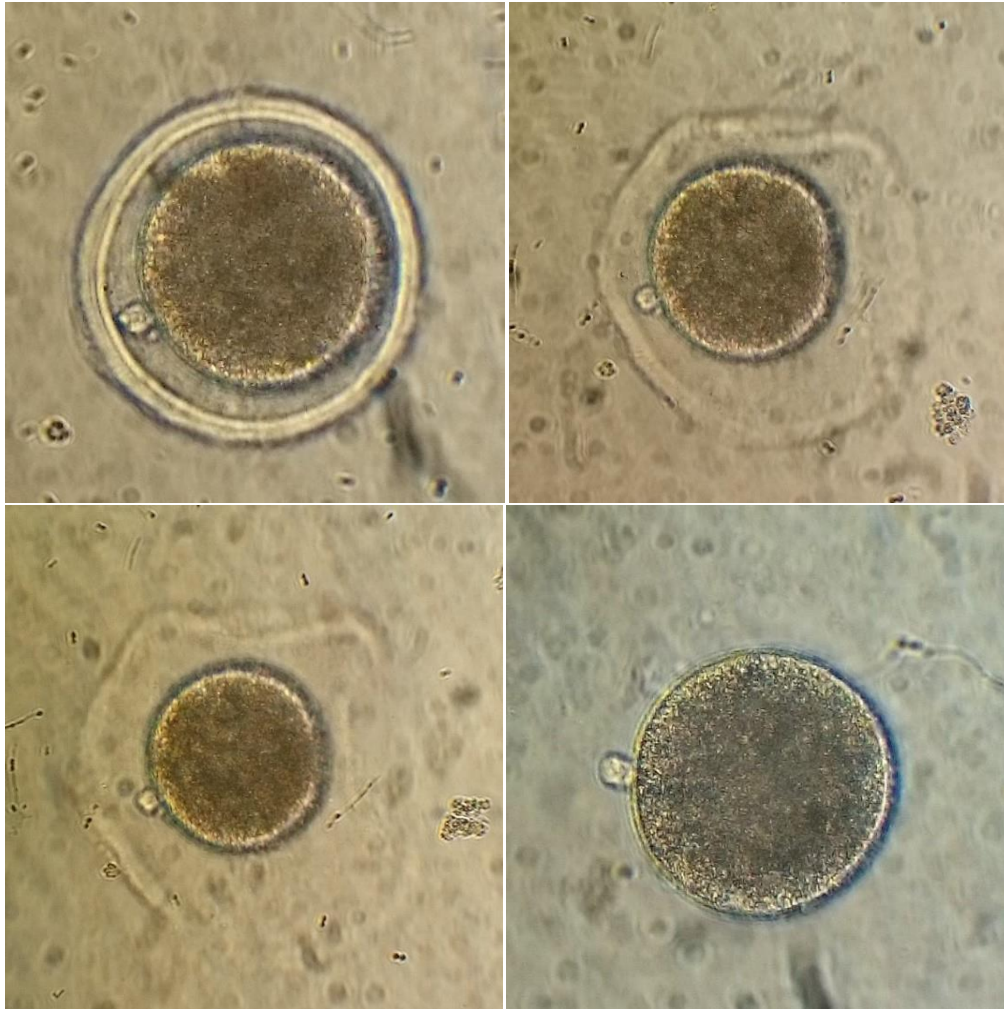


Figura 13. Ensaio de digestão da zona pelúcida (ZP) em solução de pronase 0.5%.
 (A) Oócito bovino após desnudamento (B e C) Digestão da ZP por efeito da pronase.
 (D) Oócito bovino com ZP já não mais visível, completamente digerida pela pronase.
 * Notar corpúsculo polar em oócito em metáfase II.

Foi avaliado o tempo de digestão enzimática dos oócitos imaturos. Para a pronase 0,5% o tempo de digestão médio foi de 13,64 minutos; para a quimotripsina 1%, o tempo de digestão foi de 40,80 minutos. O tempo de digestão dos oócitos imaturos, tanto para pronase como para quimotripsina, não foi comparado estatisticamente com o tempo de digestão dos oócitos maturados (CCOs e desnudos) porque para estes últimos a análise estatística dos tempos foi feita blocando-se o dia do ensaio enzimático (visto que as médias dos diferentes dias foram significativamente diferentes). O efeito bloco foi significativo, e como os oócitos imaturos não estavam representados nos mesmos dias (foram coletados em dias diferentes) tal comparação não seria fidedigna.

5.2.4 Ultraestrutura oocitária por microscopia eletrônica de transmissão

Foram processados 20 óocitos por grupo para avaliação em microscopia eletrônica de transmissão, porém algumas das amostras processadas não geraram imagens adequadas; desta forma, as imagens apresentadas nesta seção não servem para fins de comparação entre os grupos e sim têm o propósito de ilustrar alguns dos eventos que acontecem durante a maturação citoplasmática.

Na figura 16, vê-se imagem ultraestrutural de CCO bovino depois de 24 horas de maturação em meio controle, com padrão ultraestrutural compatível com maturação citoplasmática: clusters mitocondriais em região cortical, espaço perivitelínico aumentado, com microvilosidades eretas (A), microvilosidades eretas em espaço perivitelínico aumentado (B), células do *Cumulus* expandidas (C), clusters de mitocôndrias associados a gotas lipídicas (D).

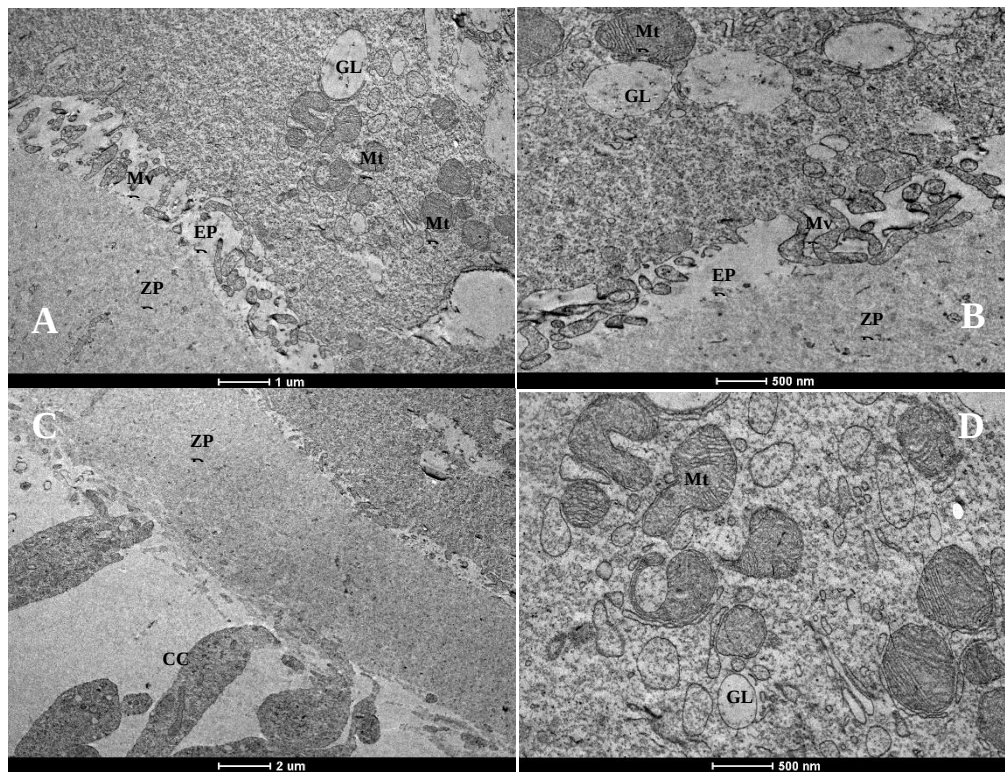


Figura 16. Ultraestrutura de CCO bovino depois de 24 horas de maturação em meio controle. ZP: zona pelúcida; EP: espaço perivitelínico Mv: microvilosidades; Mt: mitocôndria; CC: células do *Cumulus*; GL: gotas lipídicas.

A figura 17 mostra um CCO bovino imaturo (controle negativo); nota-se uma grande quantidade de vesículas dispersas pelo citoplasma e células do *Cumulus* não expandidas (A). As mitocôndrias estão na periferia e o espaço perivitelínico apresenta microvilosidades parcialmente eretas. Observam-se também grumos de grânulos corticais (B).

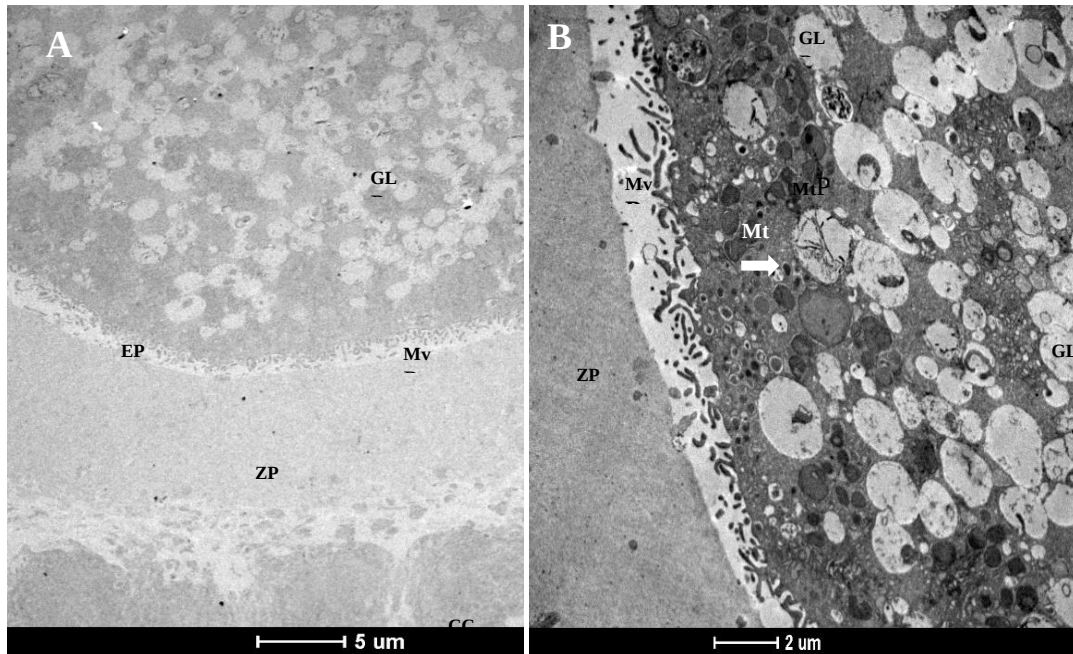


Figura 17. Ultraestrutura de CCO bovino imaturo (controle negativo). ZP: zona pelúcida; EP: espaço perivitelínico M: microvilosidades; Mt: mitocôndria; CC: células do *Cumulus*; GL: gotas lipídicas; seta: grânulos corticais

Na figura 18 vê-se um oócito desnudo maturado em meio condicionado: notar a presença de remanescentes das células do *Cumulus* desnudadas. Mitocôndrias e gotas lipídicas se aglomeraram em clusters; no entanto, o espaço perivitelínico não está aumentado e as microvilosidades não ficaram eretas.

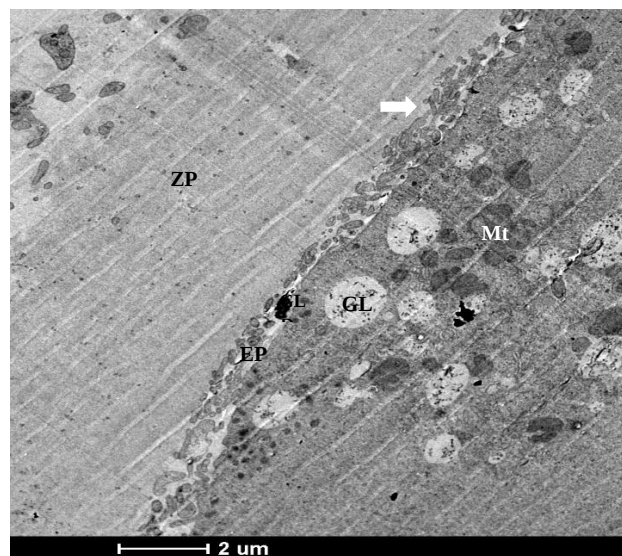


Fig. 18: Ultraestrutura de oócito desnudo maturado em meio condicionado. ZP: zona pelúcida; EP: espaço perivitelínico Mt: mitocôndria; GL: gotas lipídicas; seta: microvilosidades.

5.2.5 Expansão das células do *Cumulus*

Não houve diferença significativa entre a expansão dos CCOs maturados em meio controle (95%) e em meio condicionado (96%) (Tab.9).

Tabela 10. Taxas de expansão do *Cumulus* de CCOs maturados em meio controle e em meio condicionado

Meio de MIV	Média	Desvio padrão	CV	Mínima	Máxima	Mediana
Controle	0,95 a	0,10	11,04	0,42	1	0,98
Condicionado	0,96 a	0,05	5,45	0,79	1	0,98

Dentro da mesma coluna, valores com a mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

5.3. DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

A taxa de clivagem e a taxa de blastocistos foram comparadas para 1089 supostos zigotos de CCOS e 944 supostos zigotos de oócitos desnudos (Tab. 10 e 11).

5.3.1 Taxa de clivagem

A taxa de clivagem dos oócitos desnudos maturados no meio condicionado (28,14%) não diferiu significativamente da taxa de clivagem dos oócitos desnudos maturados no meio controle (21,53%) (Tab.10).

5.3.2 Taxa de blastocisto

Não houve diferenças significativas, tanto para CCOs como para oócitos desnudos, entre as taxas de blastocistos entre os oócitos maturados em meio controle e em meio condicionado (Tab.10).

Tabela 11. Taxa de clivagem e taxa de blastocisto para CCOs e oócitos desnudos bovinos maturados em meio controle e meio condicionado

Tipo de oócito	Meio de MIV	Número de oócitos	Taxa de Clivagem (%)	Taxa de blastocisto (%)
CCO	Controle	584	63,02 ± 20,80 a	20,20 ± 11,10 a
	Condicionado	505	66,50 ± 13,72 a	20,01 ± 10,12 a
	Total CCOs	1089	64,76 ± 17,35	20,11 ± 10,41
Desnudo	Controle	473	21,53 ± 9,40 b	4,67 ± 3,56 b
	Condicionado	471	28,14 ± 11,59 b	5,30 ± 4,71 b
	Total desnudos	944	24,84 ± 10,88	4,99 ± 4,11

Dentro da mesma coluna, valores com letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Em síntese, não houve diferenças significativas entre a maturação nuclear de complexos *Cumulus*-oócito e oócitos desnudos, bem como não houve diferenças na maturação nuclear de oócitos maturados em meio controle e em meio condicionado. A maturação citoplasmática em meio

condicionado não foi significativamente diferente da em meio controle. Oócitos desnudos apresentaram padrão de distribuição mitocondrial predominantemente heterogêneo-periférico, enquanto CCOs apresentaram padrão heterogêneo-perinuclear predominante. Oócitos desnudos maturados no meio condicionado apresentaram redução significativa do tempo de digestão da zona pelúcida em ensaio de digestão enzimática com quimotripsina 1%. Não houve diferença significativa entre a expansão das células do *Cumulus* dos CCOs maturados em meio controle e em meio condicionado. As taxas de clivagem e blastocistos foram significativamente mais altas para CCOs que para os oócitos desnudos. Não houve diferenças significativas entre as taxas de clivagem e blastocisto dos oócitos maturados em meio controle e meio condicionado.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou se o meio condicionado por células do *Cumulus oophorus* de bovinos poderia favorecer a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos desnudos, proporcionando maiores taxas de produção *in vitro* de embriões.

Para a obtenção de cada 800 µl de meio condicionado foi necessário cultivar as células do *Cumulus* obtidas por meio do desnudamento de aproximadamente 200 oócitos graus I e II. Este número é elevado, porém está de acordo com o número médio de células do *Cumulus* em um oócito grau I, de 1500 a 2000 células/oócito (Khamisi e Roberge, 2001). O cultivo de células murais da granulosa poderia levar à obtenção de uma maior quantidade de meio condicionado por oócito desnudado, porém GE; HAN; *et al.*(2008) relataram que o co-cultivo com monocamada de células da granulosa não tem efeito benéfico em oócitos desnudos de camundongos, enquanto o co-cultivo com células do *Cumulus* sim. Já foi relatado que os dois tipos celulares diferem em termos de atividades de algumas enzimas e na resposta a gonadotrofinas e IGF-1; além disso, células do *Cumulus* se replicam 10 vezes mais que células murais da granulosa e produzem 6 vezes mais progesterona (Khamisi e Roberge, 2001).

Vireque *et al.*(2013) sugere, para o cultivo de células da granulosa em humanos, uma proporção de pelo menos 85% de células viáveis; no experimento o número de células viáveis variou de 50 a 90%; o desnudamento reduziu de forma variada a viabilidade celular dos vários cultivos realizados; manteve-se sempre, porém, o número de células do *Cumulus* totais viáveis em torno de $2,4 \times 10^5$. A eficiência dos cultivos de células do *Cumulus* é afetada por vários fatores, como idade e densidade das células do *Cumulus* e presença de gonadotrofinas no meio (Ge, L. e Han e *et al.*, 2008).

Não foi determinado o padrão secretório de esteroides pelas células do *Cumulus* cultivadas, porém a presença de soro fetal bovino no meio e o padrão de crescimento em monocamada são sugestivos de uma maior proporção de secreção de progesterona e uma menor secreção de estrógeno no meio ((Langhout *et al.*, 1991; Gutiérrez e Campbell e *et al.*, 1997; Gutiérrez e Glazyrin e *et al.*, 1997b; Vireque *et al.*, 2013). Segundo Vireque *et al.*(2013), células granuloso-luteínicas, ou seja, que já sofreram ação do LH, tem baixa secreção de estradiol (Luck *et al.*, 1990) e perfil de produção hormonal desfavorável para o crescimento de folículos, com maior proporção progesterona/ estradiol no meio. No entanto, o estudo de Vireque *et al.* (2013) trabalhou com células da granulosa humanas cultivadas após o uso do hCG para

simulação do pico de LH e indução da maturação oocitária; no presente experimento foram obtidas células do *Cumulus* de oócitos imaturos e cultivadas em meio sem gonadotrofinas até atingirem a confluência na placa; somente a partir deste momento, e por um período de 14 horas, as células foram estimuladas com meio de condicionamento acrescido de LH e FHS.

Com relação ao número de oócitos que completaram a maturação nuclear (estágio de metáfase II com a emissão do primeiro corpo polar), não houve diferença significativa entre os CCOs e os oócitos desnudos (Tab.1), embora Gilchrist, R. *et al.*(2008) relatem que oócitos desnudados das células do Cumulus antes da maturação apresentam uma menor incidência de extrusão do primeiro corpo polar. Já Chian, R C *et al.*(1994) afirmam que as células do Cumulus não são necessárias para a maturação nuclear, e que a formação do pronúcleo masculino e o desenvolvimento inicial dos oócitos fertilizados é que são inibidos quando os oócitos são maturados sem as células do Cumulus.

Meios condicionados por células da granulosa favorecem a maturação nuclear e citoplasmática em bovinos (Dey et al., 2012); no entanto, neste experimento, o meio condicionado não influenciou a taxa de oócitos bovinos que concluíram a maturação nuclear.

No presente estudo, 80.05% do número total de oócitos apresentava-se em metáfase II após 24 horas de maturação (Tab.1). Segundo Sirard, M A *et al.* (1989), após 24 horas de maturação pós remoção do oócito do folículo, a maioria dos oócitos, em condições normais de cultivo, deve apresentar-se em meiose II, com a presença do primeiro corpúsculo polar.

A interrupção da retomada da meiose (oócitos em MI) ocorreu em 13,25 % dos CCOS e 18,57% dos oócitos desnudos (Tab.2.); esta condição indica competência meiótica parcial (Hampl e Eppig, 1995). A aquisição da competência meiótica acontece de forma gradual, em diferentes passos ao longo da oogênese; o oócito primeiro se torna capaz de sofrer a queda da vesícula germinativa, e em seguida de finalizar a meiose até chegar ao estágio de MII. Oócitos de folículos pequenos tem baixa competência para a meiose e atingem apenas o estágio de MI (Cecconi *et al.*, 2008). Os valores similares de GV/MI e MI/MII neste experimento sugerem que a progressão meiótica ocorreu com cinética similar nos dois grupos de oócitos, CCOs e desnudos, independentemente do tratamento.

Resultados de diferentes estudos com co-cultivos celulares suportam a hipótese de que os sinais indutores da meiose são entregues ao oócito via células do *Cumulus*. Em camundongos, Su *et al.*(2009) demonstraram que fatores parácrinos derivados do oócito induzem suas células do *Cumulus*, estimuladas por gonadotrofinas, a produzir sinais estimulando tanto a maturação nuclear como a maturação citoplasmática. Fatores parácrinos das células do *Cumulus* capazes de estimular a retomada da meiose também atuam diretamente em oócitos desnudos, independentemente da transferência de moléculas via *gap junctions* (Cecconi *et al.*, 2008). Portanto, poder-se-ia supor a existência de fatores parácrinos secretados pelas células do *Cumulus* no meio condicionado e transferidos via meio aos oócitos desnudos e CCOs, estimulando a maturação nuclear – ou poder-se-ia esperar uma pequena proporção de oócitos oriundos de folículos pequenos que se beneficiaria da maturação no meio condicionado - Cecconi *et al.* (2008) relatam que uma porção significativa de oócitos oriundos de folículos pequenos, quando em co-cultivo com células do *Cumulus* ou em meios condicionados, é capaz de chegar até a metáfase II – porém não houve diferença significativa no grau de maturação nuclear dos oócitos maturados em meio condicionado e maturados em meio controle.

Com relação à maturação citoplasmática, é difícil uma comparação geral entre os achados deste estudo e outros em que outras espécies ou estudos *in vitro* foram utilizados. Além disso, na literatura, a definição da distribuição das mitocôndrias dentro do ooplasma ao longo do processo de maturação é controversa (Bavister e Squirrell, 2000; Tarazona *et al.*, 2006; Ge, LI e Sui *et al.*, 2008; Ambruosi *et al.*, 2009; Machatkova *et al.*, 2012).

A variedade de classificações em termos de distribuição mitocondrial também está relacionada com a grande variedade na distribuição mitocondrial entre espécies (suínos (Sun, Q. *et al.*, 2001; Torner *et al.*, 2004), humanos (Wilding *et al.*, 2001), camundongos (Bavister e Squirrell, 2000), bovinos (Katska-Ksiazkiewicz *et al.*, 2011), equinos (Ambruosi *et al.*, 2009) de modo que a comparação da função mitocondrial e a localização física das mitocôndrias é complicada. De qualquer forma, homogeneidade (imaturos) e heterogeneidade (maturados) parecem ser os dois principais padrões de distribuição mitocondrial nos oócitos. Desta forma, o termo maturação citoplasmática, usado didaticamente na descrição dos resultados deste estudo, deve ser visto com cautela, uma vez que estamos nos referindo a apenas este indicador de maturação citoplasmática, a homogeneidade ou heterogeneidade da distribuição mitocondrial.

A maturação citoplasmática dos CCOs em meio condicionado não foi significativamente diferente da dos CCOs em meio controle, bem como a maturação citoplasmática dos oócitos desnudos em meio condicionado não foi significativamente diferente da dos oócitos desnudos em meio controle (Tab.3); ou seja, o meio condicionado não alterou a maturação mitocondrial dos oócitos.

A porcentagem de oócitos que alcançaram a maturação citoplasmática também não diferiu entre CCOs e oócitos desnudos, independentemente do meio de maturação (Tab.4). A única diferença significativa encontrada foi quanto aos padrões de distribuição mitocondrial, na comparação entre CCOs e desnudos, independentemente do meio de maturação (Tab.5); verifica-se que o padrão predominante nos desnudos é o padrão periférico, enquanto nos CCOs o padrão predominante é o perinuclear; e, quando se considera apenas o tratamento controle, comparando o padrão periférico e o periférico-perinuclear entre CCOs e desnudos, vemos que os desnudos apresentam uma maior proporção de distribuição periférica que os CCOs. Segundo Stojkovic (2001) as mitocôndrias se encontram na periferia do ooplasma antes da maturação e se movimentam em direção ao centro do ooplasma após a maturação, formando clusters, e diz que esta movimentação é observada apenas em oócitos de maior competência. O aumento do nível de agregação mitocondrial em torno do núcleo indica uma maturação mais completa dos oócitos (Torner *et al.*, 2004). Desta forma, pode-se supor que as mitocôndrias dos oócitos desnudos foram capazes de se organizar em cluster periféricos, mas não de se deslocar para regiões centrais, caracterizando uma maturação citoplasmática parcial. Estes dados de certa forma podem explicar o fato de que, neste estudo, a maturação citoplasmática dos CCOs não tenha sido significativamente diferente da dos desnudos, embora dos desnudos se esperasse uma menor maturação citoplasmática (visto que a remoção das células do *Cumulus* antes da maturação altera a redistribuição e a função das mitocôndrias (Ge, LI e Sui *et al.*, 2008)).

Dos 217 oócitos que tiveram maturação nuclear e citoplasmática avaliadas simultaneamente (Tab.7), 4,61% apresentaram maturação citoplasmática (mitocôndrias ativadas e em clusters), porém com oócito em MI. A distribuição homogênea das mitocôndrias ao longo do citoplasma é mais comum no estágio de vesícula germinativa, enquanto a distribuição heterogênea é mais comumente observada em oócitos em metáfase I ou II, mas não há uma associação rígida entre maturação meiótica e maturação citoplasmática, visto que elas podem estar dissociadas (Torner *et al.*, 2004). Nos oócitos bovinos, a maior atividade mitocondrial está associada à maior competência meiótica, mas oócitos meioticamente menos competentes podem aumentar sua

atividade mitocondrial durante a maturação (Machatkova *et al.*, 2012). Segundo Jeseta *et al.* (2014), oócitos mais competentes ativam as mitocôndrias duas vezes durante a maturação, antes da retomada da meiose e antes da conclusão da maturação, enquanto os oócitos menos competentes apenas uma vez, antes da maturação.

Optou-se, neste estudo, por realizar ensaios de digestão da ZP com duas enzimas diferentes, quimotripsina a 1% e pronase a 0,5%, pelo fato que, na literatura, as referências para estes ensaios utilizem majoritariamente essas duas enzimas.

Testou-se inicialmente a quimotripsina na concentração de 0,25%, segundo Murayama *et al.* (2013), porém ela não foi capaz de digerir a ZP de oócitos bovinos pós maturação mesmo após um período de 24 horas. Matson *et al.* (1997), trabalhando com oócitos de camundongos, testou as concentrações de 0,25, 0,5 e 1% e sugeriu o uso da quimotripsina 1% para manter os tempos de digestão dentro de limites práticos, e esta foi, portanto, a concentração utilizada neste experimento.

Os tempos de digestão da ZP pelas duas enzimas (Tab. 8 e 9) foram superiores no presente estudo em relação a relatos anteriores (Smorag e Katska, 1988; Schiewe *et al.*, 1995; Matson *et al.*, 1997; Kolbe e Holtz, 2005; Murayama *et al.*, 2013). Algumas possíveis explicações para tais diferenças seriam: Matson *et al.* (1997) relatam a existência de informações conflitantes quanto à potência de diferentes enzimas para digerir a zona, sugerindo diferenças na pureza e propriedades das preparações individuais, além das variações entre espécies; além disso, a proporção enzima/oócito varia, nos diferentes protocolos de digestão, de 2 mL/ oócito até 50 mL/ oócito.

No ensaio com quimotripsina 1% houve diferença significativa entre o tempo médio de digestão dos CCOs (77,48 min.) e o tempo médio de digestão dos oócitos desnudos (14,33 min.) (Tab.8), porém de maneira inversa à relatada na literatura, com um tempo muito superior para a digestão dos CCOs, o que não seria de se esperar. Ge *et al.* (2008) relatam um T75 (tempo para a digestão de 75% dos oócitos) em quimotripsina 1% significativamente mais longo em oócitos desnudos (24,8 minutos) que em CCOs (9,7 minutos) e que em oócitos pós maturação *in vivo* (0,5 minutos).

Os oócitos desnudos maturados no meio condicionado apresentaram redução significativa do tempo de digestão da zona pelúcida no ensaio de digestão enzimática com quimotripsina 1% (12,71 min.), em comparação com os oócitos desnudos maturados no meio convencional (15,95 min.) (Tab.8). Não foram encontrados relatos na literatura sobre o efeito de meios condicionados na redução do tempo de digestão da zona pelúcida em oócitos desnudos de bovinos, porém pode-se extrapolar com relação aos efeitos descritos para co-cultivos com células da granulosa, considerando que vários estudos relatam que meios condicionados exercem efeitos semelhantes (Kobayashi *et al.*, 1992; Mermillod *et al.*, 1993; Lee, Y.L. *et al.*, 2003; Hernandez-Ledezma *et al.*, 2017) ou parcialmente semelhantes aos efeitos do co-cultivo. Ge *et al.* (2008) reportam uma redução do endurecimento da zona pelúcida de oócitos desnudos quando maturados *in vitro* com células da granulosa; GE; SUI; *et al.* (2008) relatam uma redução significativa do tempo de digestão de oócitos desnudos quando estes foram maturados em co-cultivo com CCOs. Dey *et al.* (2012) relatam efeito sinérgico do co-cultivo de CCOs e oócitos desnudos na prevenção do endurecimento da zona pelúcida dos oócitos desnudos.

No entanto, não está comprovado que este menor tempo de digestão da zona pelúcida estaria associado a um melhor desenvolvimento oocitário/ embrionário em oócitos de bovinos; inclusive, neste experimento, as taxas de clivagem e as taxas de blastocistos destes oócitos desnudos que

apresentaram menor tempo de digestão não foram mais altas que os oócitos desnudos maturados no meio convencional. Em camundongos, estabeleceu-se uma relação direta entre o tempo de digestão da ZP de oócitos desnudos e uma diminuição nas taxas de fertilização (Gianfortoni e Gulyas, 1985). Também Katska *et al.*(1989) relatam influência do endurecimento da zona pelúcida nas taxas de fertilização. Porém, para oócitos de bovinos maturados *in vitro*, Coy e Grullon e *et al.*(2008) afirmam que não há evidências de que o grau de endurecimento da zona pelúcida influencie a taxa de fertilização. Segundo Lorton e First, citados por Chian, R.*et al.*(2013), oócitos bovinos se encontram totalmente livres das células do *Cumulus* 3 a 4 horas após a ovulação; sendo assim, se o oócito pode esperar pelo espermatozoide, *in vivo*, de 18 a 20 horas, sem a presença do *Cumulus*, oócitos desnudos deveriam ser capazes de ser fertilizados e se desenvolverem. A ZP de oócitos bovinos e suínos, na tuba, pós ovulação natural, é resistente à digestão enzimática, que leva de horas a dias. Sendo assim, o endurecimento da ZP deve ocorrer na tuba independentemente da fertilização (Kolbe e Holtz (2005).

A ausência deste pré-endurecimento da ZP nos oócitos maturados *in vitro* está associada com os altos índices de polispermia na FIV de bovinos e suínos (Coy e Cánovas e *et al.*, 2008). Considerando que Coy e Cánovas e *et al.*(2008), utilizando reagentes amino-reativos após a maturação para causar um leve endurecimento da ZP, conseguiu reduzir a incidência de polispermia em bovinos e suínos e melhorar em 45% a eficiência da FIV em suínos, pode-se questionar se o menor tempo de digestão da zona pelúcida pós-maturação, verificado neste estudo, seria favorável ou desfavorável; é difícil argumentar neste sentido porque tampouco se sabe se uma maior rigidez da ZP pós maturação *in vitro* poderia ser comparada à maior rigidez da ZP adquirida naturalmente na tuba pós ovulação *in vivo* e se a dinâmica de endurecimento e sua ação anti-polispermia seriam similares. Caso no presente estudo tivessem sido avaliadas as taxas de fertilização monospérmica e polispérmica, poder-se-ia entender melhor a relação entre grau de resistência à digestão da ZP / taxa de fertilização, mas tal avaliação não foi feita.

Dey *et al.*(2012) relatam que o co-cultivo de oócitos desnudos de bovinos com CCOs aumenta a solubilidade da ZP à pronase, com subsequente aumento na taxa de fertilização monospérmica e uma redução na polispermia. No entanto, não está claro se o efeito positivo ocorre por ação das células do *Cumulus* dos CCOs nos oócitos desnudos, ou se pela ação de fatores secretados pelo oócito, porque os efeitos verificam-se tanto nos oócitos desnudos como nos CCOs.

Foi avaliado também o tempo de digestão enzimática dos oócitos imaturos, que para a pronase 0,5% foi de 13,64 minutos (Tab.9). Katska *et al.*(1989), com pronase 0,1%, em oócitos imaturos de bovinos, relatam um tempo médio de digestão de apenas 4,6 minutos. No presente experimento esperar-se-ia um tempo menor de digestão para a pronase, inclusive por se utilizar uma concentração maior da enzima; uma possível explicação seria o número de oócitos por mL de enzima; neste estudo usou-se uma proporção de 3 mL para cada oócito; o estudo de Katska *et al.*(1989) não reporta este dado. Com relação à quimotripsina 1%, o tempo de digestão foi de 40,80 minutos. Murayama *et al.*(2013) relata tempo de digestão de oócitos imaturos à quimotripsina 0,25% de 326 minutos, porém em oócitos de camundongos e com uma menor concentração da quimotripsina.

Tendo-se descrito os resultados de digestão enzimática, deve-se, porém, alertar para o fato de que houve inconsistências nos resultados obtidos com as duas enzimas utilizadas e a interpretação destes resultados deve, portanto, ser feita com cautela.

As taxas de clivagem e blastocisto dos oócitos desnudos (24,84% e 4,99%) foram significativamente mais baixas que as dos CCOs (64,76% e 20,11%) (Tab.11). Comprovadamente, oócitos desnudos das células do *Cumulus* antes da maturação apresentam uma menor incidência de extrusão do primeiro corpo polar e menores taxas de clivagem e blastocistos (Gilchrist, R. *et al.*, 2008). Oócitos bovinos desnudos têm taxa de clivagem muito baixa (Sirard, M.A. *et al.*, 2006).

A taxa de clivagem dos oócitos desnudos maturados no meio condicionado (28,14%) não diferiu significativamente da dos oócitos desnudos maturados no meio controle (21,53%) (Tab.11), embora, com base na literatura, fosse possível supor que meios condicionados melhorariam a clivagem de oócitos desnudos: Fatehi *et al.* (2002) relata que a utilização de um meio condicionado por células do *Cumulus* melhorou a taxa de clivagem de oócitos desnudos de 14% para 36%, e conclui que a remoção do *Cumulus* afeta a taxa de clivagem dos oócitos desnudos devido à perda de um fator secretado por estas células, supostamente a progesterona; quando o meio condicionado é tratado com carvão ativado há perda completa dos efeitos positivos do meio na taxa de clivagem, e quando se adiciona progesterona ao meio tratado com carvão restauram-se parcialmente os efeitos benéficos do meio condicionado.

Não houve diferenças significativas entre as taxas de blastocistos entre os oócitos maturados em meio controle e em meio condicionado (Tab.11), o que se assemelha ao encontrado na literatura. Heng e Chye (2004) descrevem efeitos positivos do co-cultivo de oócitos desnudos com células da granulosa em suínos porém enfatizam que estes efeitos não se traduziram em uma maior competência para o desenvolvimento na fertilização *in vitro* e no cultivo dos blastocistos. Malekshah *et al.* (2006) relatam que, embora meios condicionados por células da granulosa tenham efeitos benéficos no desenvolvimento embrionário, não são tão efetivos como o co-cultivo com estas células. Ge, Han *et al.* (2008) indicam que tanto o co-cultivo com células do *Cumulus* como o cultivo em meio condicionado por monocamada de células do *Cumulus* são capazes de promover a maturação e restaurar o potencial de desenvolvimento de oócitos com a presença de *Corona radiata*, porém restauram apenas parcialmente a competência de oócitos desprovidos de *Corona radiata*. Em bovinos, o co-cultivo de oócitos desnudos tanto com células do *Cumulus* (Zhang, L. *et al.*, 1995) como com células murais da granulosa (Ikeda *et al.*, 2000) aumentou a formação de blastocistos. Já um efeito benéfico das células murais da granulosa de suínos na maturação nuclear de oócitos desnudos de camundongos não se traduziu em aumento significativo das taxas de blastocistos (Heng e Chye, 2004).

Desta forma, considerando que o único efeito do meio condicionado foi a redução significativa do tempo de digestão dos oócitos desnudos, efeito este que deve ser visto com cautela devido à inconsistência dos resultados com as duas enzimas utilizadas, os resultados deste experimento assemelham-se ao que alguns autores na literatura indicam (Thompson e Duganzich, 1996; Poulin *et al.*, 1997), que os meios condicionados não exercem efeitos benéficos na maturação oocitária *in vitro* na comparação com os meios de maturação convencionais.

7. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais, o meio condicionado obtido a partir de células do *Cumulus oophorus* de bovinos não se mostrou superior ao meio controle com relação à maturação oocitária *in vitro* de oócitos bovinos desnudos nem com relação ao seu desenvolvimento embrionário e, portanto, não se recomenda sua incorporação às rotinas de produção, inclusive considerando que o protocolo utilizado para a obtenção do meio é de execução demorada e possibilita a obtenção de volumes muito pequenos para que se pense na utilização do meio em maior escala. No entanto, a evolução das biotécnicas da reprodução levará a um aumento da demanda para uso dos oócitos desnudos, e novas estratégias devem ser pensadas para que se obtenham meios de maturação e resultados *in vitro* mais eficientes para estes oócitos.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 455 / 2015, relativo ao projeto intitulado “Efeito de células do *Cumulus oophorus* de *Bos indicus* na maturação oocitária e desenvolvimento embrionário in vitro de *Bos taurus taurus*”, que tem como responsável Antônio de Pinho Marques Jr., está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 08/03/2016. Este certificado expira em 08/03/2021.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 455 / 2015, related to the Project entitled “Effect of *Bos indicus Cumulus* cells on in vitro oocyte maturation and embryo development of *Bos taurus*”, under the supervision of Antônio de Pinho Marques Jr., is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 08/03/2016. This certificate expires in 08/03/2021.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 08/03/2016.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha, Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005

31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil

Telefone: [\(31\) 3499-4516](tel:(31)3499-4516) – Fax: [\(31\) 3499-4592](tel:(31)3499-4592)

www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

9. REFERÊNCIAS

- ALBUZ, F. K.; SASSEVILLE, M.; LANE, M.; *et al.* 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.
- AMBRUOSI, B.; LACALANDRA, G. M.; IORGA, A. I.; *et al.* Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: Implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. *Theriogenology*, v. 71, n. 7, p. 1093–1104, 2009.
- ASSEY, R. J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; *et al.* Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Molecular Reproduction and Development*, v. 37, n. 3, p. 335–344, mar. 1994.
- AUCLAIR, S.; UZBEKOV, R.; ELIS, S.; *et al.* 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. E599–613, 2013.
- BAVISTER, B. D.; SQUIRRELL, J. M. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Human reproduction (Oxford, England)*, v. 15 Suppl 2, p. 189–98, jul. 2000.
- BEKER, A. R. C. L.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. Effect of 17 beta-estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 58, n. 9, p. 1663–73, dez. 2002.
- BLONDIN, P.; VIGNEAULT, C.; NIVET, A L.; *et al.* Improving oocyte quality in cows and heifers - What have we learned so far? *Animal Reproduction*, v. 9, n. 3, p. 281–289, 2012.
- BOLS, P. E.; YSEBAERT, M. T.; VAN SOOM, A.; *et al.* Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology*, v. 47, n. 6, p. 1221–36, 15 abr. 1997.
- CAIXETA, E. S.; MACHADO, M. F.; RIPAMONTE, P.; *et al.* 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, n. 6, p. 890, 2013.
- CALAFELL, J.; NOGUÉS, C.; PONSÀ, M.; *et al.* Zona pellucida surface of immature and in vitro matured mouse oocytes: Analysis by scanning electron microscopy. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 9, n. 4, p. 365–372, ago. 1992.
- CAMPBELL, B.; SCARAMUZZI, R.; WEBB, R. Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. *Journal of reproduction and fertility*, v. 106, n. 1, p. 7–16, jan. 1996.
- CAMUSSI, GIOVANNI; DEREGIBUS, MARIA C.; BRUNO, STEFANIA; *et al.* Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney International*, v. 78, n. 9, p. 838–848, 2010.
- CECCONI, S.; MAURO, A.; CAPACCHIETTI, G.; *et al.* Meiotic maturation of incompetent prepubertal sheep oocytes is induced by paracrine factor(s) released by gonadotropin-stimulated oocyte-cumulus cell complexes and involves mitogen-activated protein kinase activation. *Endocrinology*, v. 149, n. 1, p. 100–107, 2008.
- CHEN, L.; RUSSELL, P. T.; LARSEN, W. J. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: Roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Molecular Reproduction and Development*, v. 34, n. 1, p. 87–93, jan. 1993.
- CHIAN, R C; NIWA, K; SIRARD, M A. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation

- and subsequent early development of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology*, v. 41, n. 7, p. 1499–508, 1994.
- CHIAN, RI CHENG; UZELAC, PETER S.; NARGUND, GEETA. In vitro maturation of human immature oocytes for fertility preservation. *Fertility and Sterility*, v. 99, n. 5, p. 1173–1181, 2013.
- CHOI, BYUNG HYUN; BANG, JAE IL; JIN, JONG IN; *et al.* Coculturing cumulus oocyte complexes with denuded oocytes alters zona pellucida ultrastructure in invitro matured bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 80, n. 9, p. 1117–1123, 2013.
- CLEMENTE, M.; DE LA FUENTE, J.; FAIR, T.; *et al.* Progesterone and conceptus elongation in cattle: A direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction*, v. 138, n. 3, p. 507–517, 2009.
- COMBELLES, C M H; CEKLENIK, N A; RACOWSKY, C; *et al.* Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. *Human Reproduction*, v. 17, n. 4, p. 1006–1016, 2002.
- COY, PILAR; CÁNOVAS, SEBASTIÁN; MONDÉJAR, IRENE; *et al.* Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 41, p. 15809–15814, 2008.
- COY, PILAR; GRULLON, LUIS; CANOVAS, SEBASTIAN; *et al.* Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction*, v. 135, n. 1, p. 19–27, 2008.
- CRAN, D G. Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, v. 38, p. 49–62, 1989.
- DA SILVEIRA, JULIANO C.; VEERAMACHANENI, D.N. RAO; WINGER, QUINTON A.; *et al.* Cell-Secreted Vesicles in Equine Ovarian Follicular Fluid Contain miRNAs and Proteins: A Possible New Form of Cell Communication Within the Ovarian Follicle1. *Biology of Reproduction*, v. 86, n. 3, p. 1–10, 2012.
- DE FELICI, M.; SALUSTRI, A.; SIRACUSA, G. “Spontaneous” hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during in vitro culture. II. The effect of follicular fluid and glycosaminoglycans. *Gamete Research*, v. 12, n. 3, p. 227–235, 1985.
- DE JONG, OLIVIER G.; VAN BALKOM, BAS W. M.; SCHIFFELERS, RAYMOND M.; *et al.* Extracellular Vesicles: Potential Roles in Regenerative Medicine. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. December, p. 1–13, 2014.
- DEY, S. R.; DEB, G. K.; HA, A. N.; *et al.* Coculturing denuded oocytes during the in vitro maturation of bovine cumulus oocyte complexes exerts a synergistic effect on embryo development. *Theriogenology*, v. 77, n. 6, p. 1064–1077, 2012.
- DIELEMAN, S. J.; KRUIP, TH. A. M.; FONTIJNE, P.; *et al.* Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. *Journal of Endocrinology*, v. 97, n. 1, p. 31–NP, 1 abr. 1983.
- DIRNFELD, MARTHA; GOLDMAN, SHLOMIT; GONEN, Yael; *et al.* A simplified coculture system with luteinized granulosa cells improves embryo quality and implantation rates: A controlled study. *Fertility and Sterility*, v. 67, n. 1, p. 120–122, 1997.
- DONAHUE, ROGER P. Maturation of the mouse oocyte in vitro. I. Sequence and timing of

- nuclear progression. *Journal of Experimental Zoology*, v. 169, n. 2, p. 237–249, out. 1968.
- DRAGOVIC, REBECCA A.; RITTER, LESLEY J.; SCHULZ, SAMANTHA J.; *et al.* Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology*, v. 146, n. 6, p. 2798–2806, 2005.
- DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, v. 55, n. 6, p. 1211–1239, 2001.
- DURLINGER, A L; VISSER, J A; THEMMEN, A P. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction*, v. 124, n. 5, p. 601–609, 2002.
- EBERT, K M; LIEM, H; HECHT, N B. Mitochondrial DNA in the mouse preimplantation embryo. *Journal of reproduction and fertility*, v. 82, n. 1, p. 145–9, jan. 1988.
- EDWARDS, SARA J.; READER, KAREN L.; LUN, STAN; *et al.* The cooperative effect of growth and differentiation factor-9 and bone morphogenetic protein (BMP)-15 on granulosa cell function is modulated primarily through BMP receptor II. *Endocrinology*, v. 149, n. 3, p. 1026–1030, 2008.
- EICHENLAUB-RITTER, U; VOGT, E; YIN, H; *et al.* Spindles, mitochondria and redox potential in ageing oocytes. *Reproductive biomedicine online*, v. 8, n. 1, p. 45–58, jan. 2004.
- EPPIG, J. J.; DOWNS, M. S. Chemical Signals that Regulate Maturation. *Biology of reproduction*, v. 30, p. 1–11, 1984.
- EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v. 122, n. 6, p. 829–838, 2001.
- EPPIG, J J; WIGGLESWORTH, K; PENDOLA, F; *et al.* Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biol Reprod*, v. 56, n. 4, p. 976–984, 1997.
- EPPIG, JJ. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 8, n. 4, p. 485, 1996.
- ERENO, R. L.; LOUREIRO, B.; CASTILHO, A. C S; *et al.* Expression of mRNA Encoding the LH Receptor (LHR) and LHR Binding Protein in Granulosa Cells from Nelore (*Bos indicus*) Heifers Around Follicle Deviation. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 50, n. 6, p. 952–957, 2015.
- FABBRI, RAFFAELLA; PORCU, ELEONORA; MARSELLA, TIZIANA; *et al.* Human embryo development and pregnancies in an homologous granulosa cell coculture system. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2000.
- FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction and Development*, v. 42, n. 4, p. 437–442, dez. 1995.
- FAIR, TRUDEE; HYTTEL, POUL; LONERGAN, PAT; *et al.* Immunolocalization of Nucleolar Proteins During Bovine Oocyte Growth, Meiotic Maturation, and Fertilization1. *Biology of Reproduction*, v. 64, n. 5, p. 1516–1525, 1 maio 2001.
- FATEHI, A. N.; ZEINSTRA, E. C.; KOOLIJ, R. V.; *et al.* Effect of cumulus cell removal of in vitro matured bovine oocytes prior to in vitro fertilization on subsequent cleavage rate. *Theriogenology*, v. 57, n. 4, p. 1347–1355, 2002.
- FENG, GUIXUE; SHI, DESHUN; YANG, SHUFANG; *et al.* Co-culture embedded in cumulus clumps promotes maturation of denuded oocytes and reconstructs gap junctions between oocytes and cumulus cells. *Zygote (Cambridge, England)*, v. 21, n. 3, p. 231–7, 2013.

- FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; *et al.* Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, v. 71, n. 5, p. 836–848, 2009.
- FLÉCHON, JACQUES E.; KOPECNY, VACLAV; PIVKO, JURAJ; *et al.* Texture of the zona pellucida of the mature pig oocyte. The mammalian egg envelope revisited. *Reproduction Nutrition Development*, v. 44, n. 3, p. 207–218, maio 2004.
- FORTUNE, J.E; RIVERA, G.M; YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*, v. 82–83, p. 109–126, jul. 2004.
- FUKUI, Y. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, v. 26, n. 1, p. 40–46, maio 1990.
- FUNAHASHI, H; EKWALL, H; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Zona reaction in porcine oocytes fertilized in vivo and in vitro as seen with scanning electron microscopy. *Biology of reproduction*, v. 63, n. 5, p. 1437–42, 2000.
- GARCÍA-HERREROS, MANUEL; BERMEJO-ÁLVAREZ, PABLO; RIZOS, DIMITRIOS; *et al.* Intrafollicular testosterone concentration and sex ratio in individually cultured bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 22, n. 3, p. 533, 2010.
- GE, L.; HAN, D.; LAN, G.; *et al.* Factors affecting the in vitro action of cumulus cells on the maturing mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, v. 75, n. 1, p. 136–142, jan. 2008.
- GE, LI; SUI, HONG SHU; LAN, GUO CHENG; *et al.* Coculture with cumulus cells improves maturation of mouse oocytes denuded of the cumulus oophorus: observations of nuclear and cytoplasmic events. *Fertility and Sterility*, v. 90, n. 6, p. 2376–2388, 2008.
- GIANFORTONI, JOSEPH G.; GULYAS, BELA J. The effects of short-term incubation (aging) of mouse oocytes on in vitro fertilization, zona solubility, and embryonic development. *Gamete Research*, v. 11, n. 1, p. 59–68, 1985.
- GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science*, v. 82–83, p. 431–446, 2004.
- GILCHRIST, R.; LANE, M.; THOMPSON, J. Oocyte-secreted factors: Regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*, v. 14, n. 2, p. 159–177, 2008.
- GOOVAERTS, I. G F; LEROY, J. L M R; RIZOS, D.; *et al.* Single in vitro bovine embryo production: Coculture with autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and gene expression profiles. *Theriogenology*, v. 76, n. 7, p. 1293–1303, 2011.
- GOUD, P. T.; GOUD, A. P.; QIAN, C.; *et al.* In-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: Role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. *Human Reproduction*, v. 13, n. 6, p. 1638–1644, 1998.
- GUTIÉRREZ, C. G.; GLAZYRIN, A. L.; ROBERTSON, G. W.; *et al.* Ultra-structural characteristics of bovine granulosa cells associated with maintenance of oestradiol production in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 134, n. 1, p. 51–58, 1997a.
- GUTIÉRREZ, 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. 56, n. 3,

- p. 608–16, mar. 1997.
- GUTIÉRREZ, C G; GLAZYRIN, A L; ROBERTSON, G W; *et al.* Ultra-structural characteristics of bovine granulosa cells associated with maintenance of oestradiol production in vitro. *Molecular and cellular endocrinology*, v. 134, n. 1, p. 51–8, 31 out. 1997b.
- GUTNISKY, CYNTHIA; DALVIT, GABRIEL C.; PINTOS, LAURA N.; *et al.* Influence of hyaluronic acid synthGUTNISKY, C. *et al.* Influence of hyaluronic acid synthesis and cumulus mucification on bovine oocyte in vitro maturation, fertilisation and embryo development. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 19, n. 3, p. 488,. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 19, n. 3, p. 488, 2007.
- GWATKIN, R B L. Effect of Enzymes and Acidity on the Zona Pellucida of the Mouse Egg Before and After Fertilization. *Journal of reproduction and fertility*, v. 7, n. 1953, p. 99–105, 1963.
- HAMPL, A; EPPIG, J J. Analysis of the mechanism(s) of metaphase I arrest in maturing mouse oocytes. *Development (Cambridge, England)*, v. 121, n. 4, p. 925–33, abr. 1995.
- HANDEL, M; EPPIG, J. 10 Sexual Dimorphism in the Regulation of Mammalian Meiosis. *Current Topics in Developmental Biology Volume 37*. [S.l.]: Elsevier, 1997. p. 333–358.
- HARPER, K M; BRACKETT, B G. Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biology of reproduction*, v. 48, n. 2, p. 409–16, 1993.
- HASHIMOTO, S; SAEKI, K; NAGAO, Y; *et al.* Effects of cumulus cell density during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 49, n. 8, p. 1451–1463, jun. 1998.
- HASHIMOTO, SHU. Application of In Vitro Maturation to Assisted Reproductive Technology. *J Reprod Dev.*, v. 55, n. 1, p. 1–10, 2009.
- HEINZMANN, J.; HANSMANN, T.; HERRMANN, D.; *et al.* Epigenetic profile of developmentally important genes in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, v. 78, n. 3, p. 188–201, mar. 2011.
- HENG, BOON CHIN ALEXIS; CHYE, NG SOON. Investigations of oocyte in vitro maturation within a mouse model. *Zygote*, v. 12, n. 1, p. 1–18, 2004.
- HERNANDEZ-LEDEZMA, J J; VILLANUEVA, C; SIKES, J D; *et al.* Comparison of co-culture and conditioned medium on expansion and hatching of in vitro-derived bovine blastocysts. *Theriogenology*, v. 43, n. 1, p. 233, 1995.
- HERNANDEZ-LEDEZMA, J J; VILLANUEVA, C; SIKES, J D; *et al.* Comparison of co-culture and conditioned medium on expansion and hatching of in vitro-derived bovine blastocysts. *Theriogenology*, doi: 10.1016/0093-691X(95)92387-O, v. 43, n. 1, p. 233, 18 ago. 2017.
- HUMBLLOT, P.; HOLM, P.; LONERGAN, P.; *et al.* Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 63, n. 4, p. 1149–1166, mar. 2005.
- HYTTEL, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T. A comparative ultrastructural study of in vivo versus in vitro fertilization of bovine oocytes. *Anatomy and Embriology*, v. 179, p. 435–442, 1989.
- HYTTEL, P; GREVE, T; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, v. 38, p. 35–47, 1989.
- IJAZ, A; LAMBERT, R D; SIRARD, M A. In vitro-cultured bovine granulosa and oviductal cells secrete sperm motility-maintaining factor(s). *Molecular reproduction and development*, v. 37,

- n. 1, p. 54–60, jan. 1994.
- IKEDA, SHUNTARO; ICHIHARA-TANAKA, KEIKO; AZUMA, TOHRU; *et al.* Effects of Midkine During In Vitro Maturation of Bovine Oocytes on Subsequent Developmental Competence. *Biology of Reproduction*, v. 63, n. 4, p. 1067–1074, 1 out. 2000.
- ISHIWATA, I; TOKIEDA, Y; KIGUCHI, K; *et al.* Effects of embryotrophic factors on the embryogenesis and organogenesis of mouse embryos in vitro. *Human cell*, v. 13, n. 4, p. 185–95, dez. 2000.
- JESETA, M; CTVRTLÍKOVÁ KNITLOVÁ, D; HANZALOVÁ, K; *et al.* 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, jun. 2014.
- JOO, BO SUN; KIM, MI KYUNG; NA, YONG JIN; *et al.* The mechanism of action of coculture on embryo development in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components. *Fertility and Sterility*, v. 75, n. 1, p. 193–199, jan. 2001.
- KACINSKIS, MIRELLA ÁVILA; LUCCI, CAROLINA MADEIRA; LUQUE, MARIA CAROLINA AQUINO; *et al.* Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 87, n. 1–2, p. 45–57, jun. 2005.
- KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; ALM, H.; TORNER, H.; *et al.* Mitochondrial aggregation patterns and activity in in vitro cultured bovine oocytes recovered from early antral ovarian follicles. *Theriogenology*, v. 75, n. 4, p. 662–670, 2011.
- KATSKA, L.; KAUFFOLD, P.; SMORAG, Z.; *et al.* Influence of hardening of the zona pellucida on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 32, n. 5, p. 767–777, nov. 1989.
- KHALILIAN, M.; NAVIDBAKHS, M.; REZAZADEH VALOJERDI, M.; *et al.* Alteration in the Mechanical Properties of Human Ovum Zona Pellucida Following Fertilization: Experimental and Analytical Studies. *Experimental Mechanics*, v. 51, n. 2, p. 175–182, 2011.
- KHAMSI, F.; ROBERGE, S. Granulosa cells of the cumulus oophorus are different from mural granulosa cells in their response to gonadotrophins and IGF-I. *Journal of Endocrinology*, v. 170, n. 3, p. 565–573, 2001.
- KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, v. 54, n. 5, p. 741–756, 2000.
- KIDSON, ANNADIE; SCHOEVERS, ERIC; LANGENDIJK, PIETER; *et al.* The effect of oviductal epithelial cell co-culture during in vitro maturation on sow oocyte morphology, fertilization and embryo development. *Theriogenology*, v. 59, n. 9, p. 1889–1903, 2003.
- KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction*, v. 121, n. 4, p. 503–512, 2001.
- KOBAYASHI, K.; TAKAGI, Y.; SATOH, T.; *et al.* Development of early bovine embryos to the blastocyst stage in serum-free conditioned medium from bovine granulosa cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, v. 28, n. 4, p. 255–259, 1992.
- KOLBE, THOMAS; HOLTZ, WOLFGANG. Differences in proteinase digestibility of the zona pellucida of in vivo and in vitro derived porcine oocytes and embryos. *Theriogenology*, v. 63, n. 6, p. 1695–1705, 2005.
- KRUIP, T. A. M.; CRAN, D. G.; VAN BENEDEN, T. H.; *et al.* Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. *Gamete Research*, v. 8, n. 1, p. 29–47, 1983.
- LANGHOUT, D J; SPICER, L J; GEISERT, R D. Development of a culture system for bovine

- granulosa cells: effects of growth hormone, estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis, and protein synthesis. *Journal of animal science*, v. 69, n. 8, p. 3321–34, ago. 1991.
- LEE, HO-JOON; QUAAS, ALEXANDER M.; WRIGHT, DIANE L.; *et al.* In vitro maturation (IVM) of murine and human germinal vesicle (GV)–stage oocytes by coculture with immortalized human fallopian tube epithelial cells. *Fertility and Sterility*, v. 95, n. 4, p. 1344–1348, mar. 2011.
- LEE, Y.L.; LEE, K.F.; XU, J.S.; *et al.* Embryotrophic Factor-3 from Human Oviductal Cells Affects the Messenger RNA Expression of Mouse Blastocyst1. *Biology of Reproduction*, v. 68, n. 2, p. 375–382, 1 fev. 2003.
- LI, GUANG PENG; BUNCH, THOMAS D.; WHITE, KENNETH L.; *et al.* Development, Chromosomal Composition, and Cell Allocation of Bovine Cloned Blastocyst Derived from Chemically Assisted Enucleation and Cultured in Conditioned Media. *Molecular Reproduction and Development*, v. 68, n. 2, p. 189–197, 2004.
- LIU, LIN; TRIMARCHI, JAMES R.; OLDENBOURG, RUDOLF; *et al.* Increased Birefringence in the Meiotic Spindle Provides a New Marker for the Onset of Activation in Living Oocytes1. *Biology of Reproduction*, v. 63, n. 1, p. 251–258, 1 jul. 2000.
- LORENZO, P L; ILLERA, M J; ILLERA, J C; *et al.* Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Journal of reproduction and fertility*, v. 101, n. 3, p. 697–701, 1994.
- LUCIANO, A. M.; LODDE, V.; BERETTA, M. S.; *et al.* 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. 389–397, 2005.
- LUCK, M R; RODGERS, R J; FINDLAY, J K. Secretion and gene expression of inhibin, oxytocin and steroid hormones during the in vitro differentiation of bovine granulosa cells. *Reproduction, fertility, and development*, v. 2, n. 1, p. 11–25, 1990.
- MACHATKOVA, M; JESETA, M; HULINSKA, P; *et al.* Characteristics of Bovine Oocytes with Different Meiotic Competence in Terms of Their Mitochondrial Status and Expression of Nuclear-Encoded Factors. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, n. 5, p. 806–814, out. 2012.
- MAEDA, J; KOTSUJI, F; NEGAMI, A; *et al.* In vitro development of bovine embryos in conditioned media from bovine granulosa cells and vero cells cultured in exogenous protein- and amino acid-free chemically defined human tubal fluid medium. *Biology of reproduction*, v. 54, n. 4, p. 930–6, 1996.
- MAGNUSSON, C.; BILLIG, H.; ENEROTH, P.; *et al.* Comparison between the progestin secretion responsiveness to gonadotrophins of rat cumulus and mural granulosa cells in vitro. *European Journal of Endocrinology*, v. 101, n. 4, p. 611–616, 1 dez. 1982.
- MALEKSHAH, ABBASALI KARIMPOUR; MOGHADDAM, AMIR ESMAILNEJAD; DARAKA, SAEED MUSAVI. Comparison of conditioned medium and direct co-culture of human granulosa cells on mouse embryo development. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 44, n. March, p. 189–192, 2006.
- MATSON, PHILLIP L.; GRAEFLING, JASON; JUNK, STEPHEN M.; *et al.* Cryopreservation of oocytes and embryos: Use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and

- formulate treatment strategies in an in-vitro fertilization programme. *Human Reproduction*, v. 12, n. 7, p. 1550–1553, 1997.
- MEHLMANN, LISA M. Stops and starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, v. 130, n. 6, p. 791–799, 2005.
- MENINO, A. R.; WRIGHT, R. W. Variation in Porcine Zona Pellucida Morphology Following Pronase Treatment. *Journal of Animal Science*, v. 55, n. 2, p. 369, 1982.
- MERMILLOD, P; VANSTEENBRUGGE, A; WILS, C; *et al.* Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos. *Biology of reproduction*, v. 49, n. 3, p. 582–587, 1993.
- MINAMI, NAOJIRO; SUZUKI, TORU; TSUKAMOTO, SATOSHI. Zygotic Gene Activation and Maternal Factors in Mammals. *Journal of Reproduction and Development*, v. 53, n. 4, p. 707–715, 2007.
- MINGOTI, G.Z; GARCIA, J.M; ROSA-E-SILVA, A.A.M. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus–oocyte-complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids. *Animal Reproduction Science*, v. 69, n. 3–4, p. 175–186, fev. 2002.
- MODINA, S; BERETTA, M; LODDE, V; *et al.* Cytoplasmic changes and developmental competence of bovine oocytes cryopreserved without cumulus cells. *European journal of histochemistry : EJH*, v. 48, n. 4, p. 337–46, 2004.
- MOOR, R.M.; SMITH, M.W.; DAWSON, R.M.C. Measurement of intercellular coupling between oocytes and cumulus cells using intracellular markers. *Experimental Cell Research*, v. 126, n. 1, p. 15–29, mar. 1980.
- MOOR, R M; CRAGLE, R G. The sheep egg: enzymatic removal of the zona pellucida and culture of eggs in vitro. *Journal of reproduction and fertility*, v. 27, n. 3, p. 401–9, 1971.
- MURAYAMA, YOSHINOBU; MIZUNO, JINJI; KAMAKURA, HIROKAZU; *et al.* Mouse zona pellucida dynamically changes its elasticity during oocyte maturation, fertilization and early embryo development. *Human cell : official journal of Human Cell Research Society*, v. 19, n. 4, p. 119–125, 2006.
- MURAYAMA, YOSHINOBU; YOSHIDA, KENTA; TAKAHASHI, HARUTAKA; *et al.* Softening of the mouse zona pellucida during oocyte maturation. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference*, v. 2013, n. Mii, p. 6834–6837, 2013.
- NOGUCHI, S; YONEZAWA, N; KATSUMATA, T; *et al.* Characterization of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1201, n. 1, p. 7–14, 28 set. 1994.
- NOGUEIRA, M F G; BURATINI, J; PRICE, C A; *et al.* Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Molecular reproduction and development*, v. 74, n. 6, p. 680–6, jun. 2007.
- NORRIS, R P; RATZAN, W J; FREUDZON, M; *et al.* Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*, v. 136, n. 11, p. 1869–1878, 2009.
- ORSI, NICOLAS M.; GOPICHANDRAN, NADIA; LEESE, HENRY J.; *et al.* Fluctuations in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrous cycle. *Reproduction*, v.

- 129, n. 2, p. 219–228, 2005.
- PAPI, MASSIMILIANO; BRUNELLI, ROBERTO; FAMILIARI, GIUSEPPE; *et al.* Whole-Depth Change in Bovine Zona Pellucida Biomechanics after Fertilization: How Relevant in Hindering Polyspermy? *PLoS ONE*, v. 7, n. 9, 2012.
- PAPI, MASSIMILIANO; BRUNELLI, ROBERTO; SYLLA, LAKAMY; *et al.* Mechanical properties of zona pellucida hardening. *European Biophysics Journal*, v. 39, n. 6, p. 987–992, 2010.
- PARIKH, FIRUZA R; NADKARNI, SUPARNA G; NAIK, NANDKISHOR J; *et al.* Cumulus coculture and cumulus-aided embryo transfer increases pregnancy rates in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, v. 86, n. 4, p. 839–47, out. 2006.
- PAULINI, FERNANDA; SILVA, RENATA CARVALHO; RÔLO, JOSÉ LUIZ JIVAGO DE PAULA; *et al.* Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. *Journal of ovarian research*, v. 7, p. 102, 2014.
- PICTON, H M; CAMPBELL, B K; HUNTER, M G. Maintenance of oestradiol production and expression of cytochrome P450 aromatase enzyme mRNA in long-term serum-free cultures of pig granulosa cells. *Journal of reproduction and fertility*, v. 115, n. 1, p. 67–77, jan. 1999.
- PINCUS, G; ENZMANN, E V. THE COMPARATIVE BEHAVIOR OF MAMMALIAN EGGS IN VIVO AND IN VITRO : I. THE ACTIVATION OF OVARIAN EGGS. *The Journal of experimental medicine*, v. 62, n. 5, p. 665–75, 31 out. 1935.
- POULIN, S.; LAFOREST, J.-P.; FORTIER, M.A.; *et al.* Effects of conditioned media on porcine embryos at different stages of development. *Theriogenology*, v. 47, n. 7, p. 1337–1345, maio 1997.
- RICHARDS, J S. New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Molecular endocrinology*, v. 15, n. 2, p. 209–218, 2001.
- RIEGER, D; LUCIANO, A M; MODINA, S; *et al.* The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes in vitro. *Journal of reproduction and fertility*, v. 112, n. 1, p. 123–30, jan. 1998.
- ROMAR, R.; COY, P.; RUIZ, S.; *et al.* Effects of oviductal and cumulus cells on in vitro fertilization and embryo development of porcine oocytes fertilized with epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, v. 59, n. 3–4, p. 975–986, 2003.
- SÁNCHEZ, FLOR; SMITZ, JOHAN. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, v. 1822, n. 12, p. 1896–1912, dez. 2012.
- SANTOS, P; CHAVEIRO, A; SIMÕES, N; *et al.* Bovine Oocyte Quality in Relation to Ultrastructural Characteristics of Zona Pellucida, Polyspermic Penetration and Developmental Competence. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, n. 6, p. 685–689, dez. 2008.
- SANTOS, S.; DANTAS, JEDINA KATO; MIRANDA, MOYSÉS DOS SANTOS; *et al.* Cinética da maturação nuclear in vitro de oócitos bubalinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 39, n. 5, 2002.
- SCHIEWE, M. C.; ARAUJO, E.; ASCH, R. H.; *et al.* Enzymatic characterization of zona pellucida hardening in human eggs and embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 12, n. 1, p. 2–7, 1995.
- SCHOENFELDER, M.; SCHAMS, D.; EINSPIANIER, R. Steroidogenesis during in vitro

- maturation of bovine cumulus oocyte complexes and possible effects of tri-butyltin on granulosa cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 84, n. 2–3, p. 291–300, 2003.
- SELA-ABRAMOVICH, SAGIT; EDRY, IRIS; GALIANI, DALIA; *et al.* Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology*, v. 147, n. 5, p. 2280–2286, 2006.
- SILVA, C C; KNIGHT, P G. Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *Journal of reproduction and fertility*, v. 119, n. 2, p. 261–9, jul. 2000.
- SIMON, A M; GOODENOUGH, D A; LI, E; *et al.* Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature*, v. 385, n. 6616, p. 525–9, 6 fev. 1997.
- SIRARD, M. Somatic environment and germinal differentiation in antral follicle: The effect of FSH withdrawal and basal LH on oocyte competence acquisition in cattle. *Theriogenology*, v. 86, n. 1, p. 54–61, jul. 2016.
- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; *et al.* Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, v. 65, n. 1, p. 126–136, 2006.
- SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, v. 55, n. 6, p. 1241–1254, 2001.
- SIRARD, M. A.; FLORMAN, H M; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M L; *et al.* Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biology of reproduction*, v. 40, n. 6, p. 1257–63, 1989.
- SIRARD, M.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; *et al.* Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, v. 65, n. 1, p. 126–136, 2006.
- SMITH, D M; TENNEY, D Y. Effects of steroids on mouse oocyte maturation in vitro. *Journal of reproduction and fertility*, v. 60, n. 2, p. 331–8, 1980.
- SMORAG, Z.; KATSKA, L. Reversible changes in dissolution of the zona pellucida of immature bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 30, n. 1, p. 13–22, jul. 1988.
- SPICER, L J; ALPIZAR, E; ECHTERNKAMP, S E. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. *Journal of animal science*, v. 71, n. 5, p. 1232–41, maio 1993.
- SPICER, LEO J.; AAD, P. Y.; ALLEN, D.; *et al.* Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. *Journal of Endocrinology*, v. 189, n. 2, p. 329–339, 2006.
- STOJKOVIC, M. Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After In Vitro Maturation: Correlation with Morphological Criteria and Developmental Capacity After In Vitro Fertilization and Culture. *Biology of Reproduction*, v. 64, n. 3, p. 904–909, 2001.
- STOJKOVIC, M.; WOLF, E.; VAN LANGENDONCKT, A.; *et al.* Correlations between chemical parameters, mitogenic activity and embryotrophic activity of bovine oviduct-conditioned medium. *Theriogenology*, v. 48, n. 4, p. 659–673, set. 1997.
- SU, YOU QIANG; SUGIURA, KOJI; EPPIG, JOHN J. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: Paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Seminars in Reproductive Medicine*, v. 27, n. 1, p. 32–42, 2009.

- SU, YOU QIANG; WU, XUEMEI; O'BRIEN, MARILYN J.; *et al.* Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: Genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop. *Developmental Biology*, v. 276, n. 1, p. 64–73, 2004.
- SUDIMAN, J.; RITTER, L. J.; FEIL, D. K.; *et al.* Effects of differing oocyte-secreted factors during mouse in vitro maturation on subsequent embryo and fetal development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 31, n. 3, p. 295–306, 2014.
- SUGIURA, KOJI; SU, YOU-QIANG; LI, QINGLEI; *et al.* Estrogen promotes the development of mouse cumulus cells in coordination with oocyte-derived GDF9 and BMP15. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, v. 24, n. 12, p. 2303–14, 2010.
- SUN, Q.; WU, G.; LAI, L.; *et al.* Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction*, v. 122, n. 1, p. 155–163, 1 jul. 2001.
- SUN, QING YUAN. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microscopy Research and Technique*, v. 61, n. 4, p. 342–348, 2003.
- SUTOVSKÝ, P; FLÉCHON, J E; FLÉCHON, B; *et al.* Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during in vitro culture of cattle oocyte cumulus complexes. *Biology of reproduction*, v. 49, n. 6, p. 1277–1287, 1993.
- SUTTON, M.; GILCHRIST, R.; THOMPSON, J. Effect of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction Update*, v. 9, n. 1, p. 35–48, 2003.
- SUTTON, M. L.; CETICA, P. D.; BECONI, M. T.; *et al.* Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction*, v. 126, n. 1, p. 27–34, 2003.
- SUZUKI, HIROYUKI; YANG, XIANGZHONG; FOOTE, ROBERT H. Surface alterations of the bovine oocyte and its investments during and after maturation and fertilization in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, v. 38, n. 4, p. 421–430, ago. 1994.
- TANGHE, SOFIE; VAN SOOM, ANN; NAUWYNCK, HANS; *et al.* Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, v. 61, n. 3, p. 414–424, 2002.
- TARAZONA, A M; RODRÍGUEZ, J I; RESTREPO, L F; *et al.* Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, v. 41, n. 1, p. 5–11, fev. 2006.
- THOMAS, R E; THOMPSON, J G; ARMSTRONG, D T; *et al.* Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during in vitro maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. *Biology of reproduction*, v. 71, n. 4, p. 1142–1149, 2004.
- THOMPSON, JEREMY G.; DUGANZICH, DAVID. Analysis of culture systems for bovine in vitro embryo production reported in abstracts of the proceedings of the International Embryo Transfer Society (1991–1995). *Theriogenology*, v. 45, n. 1, p. 195, jan. 1996.
- TORNER, H.; BRÜSSOW, K. P.; ALM, H.; *et al.* Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. *Theriogenology*, v. 61, n. 9, p. 1675–1689, 2004.
- VAN BLERKOM, J. Mitochondria as regulatory forces in oocytes, preimplantation embryos and

- stem cells. *Reproductive biomedicine online*, v. 16, n. 4, p. 553–569, 2008.
- VANDERHYDEN, B. C. Species differences in the regulation of cumulus expansion by an oocyte-secreted factor(s). *Reproduction*, v. 98, n. 1, p. 219–227, 1 maio 1993.
- VANHOUTTE, L.; NOGUEIRA, D.; DE SUTTER, P. Prematuration of human denuded oocytes in a three-dimensional co-culture system: Effects on meiosis progression and developmental competence. *Human Reproduction*, v. 24, n. 3, p. 658–669, 2009.
- VIREQUE, ALESSANDRA APARECIDA; CAMPOS, JACIRA RIBEIRO; CAMPOS, CAROLINA OLIVEIRA; *et al.* Cultura de células da granulosa humanas com fenótipo de fase folicular: Influência do sistema quimicamente definidona morfologia, ultraestrutura, secreção de esteroides e relaxina. *Reproducao e Climaterio*, v. 28, n. 3, p. 92–103, 2013.
- WANG, LI-YA; WANG, DA-HUI; ZOU, XIANG-YANG; *et al.* Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, v. 10, n. 7, p. 483–92, 2009.
- WILDING, MARTIN; DALE, BRIAN; MARINO, MARCELLA; *et al.* Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction*, v. 16, n. 5, p. 909–917, 2001.
- WOHLRES-VIANA, S.; ARASHIRO, E. K.N.; MACHADO, M. A.; *et al.* Intrafollicular oestradiol production, expression of the LH receptor (LHR) gene and its isoforms, and early follicular deviation in *Bos indicus*. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 29, n. 10, p. 1958–1970, 2017.
- WRENZYCKI, C; STINSHOFF, H. Maturation Environment and Impact on Subsequent Developmental Competence of Bovine Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 48, n. s1, p. 38–43, 1 set. 2013.
- XIONG, BO; LI, SEN; AI, JUN-SHU; *et al.* BRCA1 is required for meiotic spindle assembly and spindle assembly checkpoint activation in mouse oocytes. *Biology of reproduction*, v. 79, n. 4, p. 718–726, 2008.
- XU, JIA-SEN; CHEUNG, TAK-MING; TING-HON CHAN, SAMUEL; *et al.* Temporal Effect of Human Oviductal Cell and Its Derived Embryotrophic Factors on Mouse Embryo Development1. *Biology of Reproduction*, v. 65, n. 5, p. 1481–1488, 1 nov. 2001.
- YAMAZAKI, YUKIKO; WAKAYAMA, TERUHIKO; YANAGIMACHI, RYUZO. Contribution of cumulus cells and serum to the maturation of oocyte cytoplasm as revealed by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Zygote*, v. 9, n. 4, p. 277–282, 28 nov. 2001.
- YEO, CHRISTINE X.; GILCHRIST, ROBERT B.; LANE, MICHELLE. Disruption of Bidirectional Oocyte-Cumulus Paracrine Signaling During In Vitro Maturation Reduces Subsequent Mouse Oocyte Developmental Competence1. *Biology of Reproduction*, v. 80, n. 5, p. 1072–1080, 2009.
- YOUNIS, A. I.; BRACKETT, B. G.; FAYRER-HOSKEN, R. A. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Research*, v. 23, n. 2, p. 189–201, jun. 1989.
- YOUNIS, A.I.; BRACKETT, B.G. Importance of cumulus cells and insemination intervals for development of bovine oocytes into morulae and blastocysts in vitro. *Theriogenology*, v. 36, n. 1, p. 11–21, jul. 1991.
- YUAN, BAO; LIANG, SHUANG; JIN, YONG-XUN; *et al.* Progesterone influences cytoplasmic maturation in porcine oocytes developing *in vitro*. *PeerJ*, v. 4, n. Mii, p. e2454, 2016.

- ZHANG, LI; JIANG, SHIE; WOZNIAK, PATRICIA J.; *et al.* Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, v. 40, n. 3, p. 338–344, mar. 1995.
- ZHANG, M.; SU, YOU QIANG; SUGIURA, KOJI; *et al.* Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. *Endocrinology*, v. 152, n. 11, p. 4377–4385, 2011.
- ZHAO, XUE-MING; MIN, JIANG-TAO; DU, WEI-HUA; *et al.* Effect of mouse cumulus cells on the in vitro maturation and developmental potential of bovine denuded germinal vesicle oocytes. *Zygote*, v. 22, p. 348–355, 2013.
- ZHONG, CISHENG; ISHIMURA, KAZUNORI; YOSHINAGA-HIRABAYASHI, TOMOKO; *et al.* Immunocytochemical study on the localization of aromatase in the ovary of golden hamster, guinea pig and cow. *Acta Histochemica et Cytochemica*, v. 22, n. 5, p. 501–507, 1989.
- ZOLLER, L C; WEISZ, JUDITH. A quantitative cytochemical study of glucose-6-phosphate dehydrogenase and $\Delta 5$ -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the Membrana granulosa of the ovulable type of follicle of the rat. *Histochemistry*, v. 62, n. 2, p. 125–135, 1979.
- ZUCCOTTI, MAURIZIO; MERICO, VALERIA; CECCONI, SANDRA; *et al.* What does it take to make a developmentally competent mammalian egg? *Human Reproduction Update*, v. 17, n. 4, p. 525–540, 2011.
- ZUELKE, K A; BRACKETT, B G. Increased glutamine metabolism in bovine cumulus cell-enclosed and denuded oocytes after in vitro maturation with luteinizing hormone. *Biol Reprod*, v. 48, n. 4, p. 815–820, 1993.