

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**EXPRESSÃO GÊNICA DAS CÉLULAS DO *CUMULUS OOPHORUS* DE BOVINOS
APÓS A VITRIFICAÇÃO**

Dissertação de Mestrado

Felipe Lohman Arend

Porto Alegre

2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**EXPRESSÃO GÊNICA DAS CÉLULAS DO *CUMULUS OOPHORUS* DE BOVINOS
APÓS A VITRIFICAÇÃO**

Autor: Felipe Lohmann Arend

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências Veterinárias na área de Reprodução
Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rui Fernando Felix Lopes

Porto Alegre

2009

A681e Arend, Felipe Lohmann

Expressão gênica das células do *Cumulus oophorus* de bovinos após a vitrificação. / Felipe Lohmann Arend. – Porto Alegre: UFRGS, 2009.

60 f. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2009. Rui Fernando Felix Lopes, Orient.

1. Reprodução animal 2. Expressão gênica 3. Maturação 4. Vitrificação: bovinos I. Lopes, Rui Fernando Felix, Orient. II. Título.

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Felipe Lohmann Arend

EXPRESSÃO GÊNICA DAS CÉLULAS DO *CUMULUS OOPHORUS* DE BOVINOS
APÓS A VITRIFICAÇÃO.

Aprovada em 30 de junho de 2009.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Rui Fernando Felix Lopes
Orientador e Presidente da Comissão

Prof Dr. José Luiz Rodrigues
Membro da Comissão

Prof Dr. Adriana Bos Mikich
Membro da Comissão

Prof. Dr. Alexandre Tavares Duarte de Oliveira
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Ao professor Rui Fernando Felix Lopes pelo aprendizado desde o início da graduação, pela amizade, incentivo e pela oportunidade de realização deste trabalho;

Ao professor Alexandre Tavares Duarte de Oliveira pelo auxílio na análise dos resultados, amizade e principalmente pelo incentivo na finalização do mestrado;

Ao professor Alceu Mezzalira e equipe pelos oócitos, células da granulosa e dados referentes à produção embrionária fornecidos, possibilitando a realização dos experimentos;

À minha família que, cada um a seu modo, colaboraram para que essa etapa da minha vida pudesse ser realizada;

Aos amigos do curso de Ciências Biológicas pelo convívio, amizade e reuniões seguidas de churrasco; aos colegas de laboratório que, mesmo em tão reduzido número, auxiliaram na realização do trabalho; aos amigos que permanecem intactos à passagem do tempo, em especial a Márcio Blau; aos dindos Luis Fernando Heckler e Fabiana Thomé da Cruz pela amizade, dedicação e “jantas - terapia”;

Ao Colégio Stella Maris pela oportunidade de crescimento e realização profissional, na figura de Zóile Cecília Herrmann, Simone Dias Etchevérry e Rosaura Caverdon;

À Fernanda Arboite de Oliveira pela orientação e incentivo, principalmente nos meus momentos mais dispersivos, pela amizade, carinho e apoio, e pelo caminho que construímos e decidimos seguir, lado a lado e de mãos dadas.

RESUMO

Apesar da obtenção de animais nascidos vivos a partir de oócitos imaturos bovinos congelados ou vitrificados, um dos grandes desafios continua sendo o desenvolvimento de um método que proporcione melhores resultados de viabilidade pós-criopreservação. Assim como a ação dos crioprotetores empregados, a eficiência no processo de maturação *in vitro* (MIV) influi diretamente na taxa de desenvolvimento embrionário. Durante a maturação oocitária *in vitro* observa-se expansão e mucificação das células da granulosa que formam o complexo *cumulus oophorus*-oócito (CCO), em função da intensa síntese de componentes da matriz extracelular. Essas modificações no aspecto do *cumulus* são utilizadas como indicativo da ocorrência de maturação oocitária e contribuem para que ocorra a fecundação. A expressão gênica de proteínas associadas à matriz extracelular das células do *cumulus* pode estar sob influência de fatores de origem oocitária e de composição do meio de MIV. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão gênica das proteínas ácido hialurônico sintase 2 (HAS2), *link protein* (HAPLN1), conexina 43 (GJA1) e HSP70-1 (proteína de choque térmico) em células do *cumulus oophorus* de oócitos imaturos bovinos submetidos a exposição e/ou vitrificação em duas soluções crioprotetoras e, posteriormente, maturados *in vitro*. Foram comparadas duas soluções de vitrificação (SV): SV1 = 20% de etileno glicol (EG) + 20% de 1,2 propanediol (PRO), e SV2 = 20% de EG + 20% DMSO + 0,5M de sacarose. Os CCOs foram obtidos a partir de ovários coletados de fêmeas bovinas logo após o abate, selecionados morfológicamente e distribuídos em 6 grupos experimentais: **G1 (AOC)**, CCOs não maturados; **G2 (AMC)**, CCOs submetidos à MIV; **G3 (B1EC)**, CCOs expostos à SV1 e submetidos à MIV; **G4 (B2EC)**, CCOs expostos à SV2 e submetidos à MIV; **G5 (A1VC)**, CCOs vitrificados com a SV1 e submetidos à MIV; **G6 (A2VC)**, CCOs vitrificados com a SV2 e submetidos à MIV. A MIV foi realizada em TCM 199 suplementado com soro de égua em estro, à 39°C, 5% de CO₂ e máxima umidade relativa, por 22 a 24 horas. Após a MIV, 5 CCOs de cada grupo (**G2 a G6**), foram coletados, submetidos ao desnudamento mecânico e as células do *cumulus* foram concentradas por centrifugação e acondicionadas em tubos cônicos de 0,5 ml em nitrogênio líquido. O restante dos CCOs destes grupos foi submetido a fecundação e cultivo *in vitro* sob condições semelhantes a MIV. Para a extração do RNA total das amostras de células do *cumulus* foi utilizado o reagente TRIzol[®]. O RNA total foi re-suspenso e as amostras foram submetidas à captação específica do mRNA utilizando-se um “kit” comercial de separação magnética. Os mRNAs foram transcritos reversamente em cDNA utilizando-se a técnica de RT-PCR, para avaliar os padrões de expressão dos quatro transcritos de bovinos (*link protein*, *HAS2*, *conexina 43* e *HSP70-1*). O grupo de oócitos imaturos exposto a SV1 apresentou uma taxa de blastocistos (30,1%) semelhante ao grupo controle (38,1%) e significativamente superior ao grupo exposto a SV2, (16,9%; p=0,0013). Houve diferença significativa (p<0,0001) entre o grupo controle e os grupos vitrificados nas soluções SV1 e SV2, tanto na taxa de clivagem (respectivamente, 79,2%; 22,1% e 43,3%) quanto no desenvolvimento até o estágio de blastocisto (respectivamente, 35,6%; 0% e 4,1%). A análise dos resultados de abundância relativa obtida a partir das células do *cumulus oophorus* de 5 CCOs bovinos em cada um dos seis grupos experimentais, após três repetições, não mostrou diferença significativa entre os diferentes grupos testados para os transcritos de *link protein* (p=0,738), *HAS2* (p=0,772), *conexina 43* (p=0,130) e *HSP70-1* (p=0,333).

Palavras chave: *cumulus oophorus*, expressão gênica, maturação e vitrificação.

ABSTRACT

The major challenge in the cryopreservation of bovine immature oocytes is still developing a method that provides adequate results of survival and viability after vitrification. As the action of cryoprotectants employed, the efficiency of *in vitro* maturation (IVM) process directly influences the embryonic development. The mucification and expansion of the granulosa cells from the *cumulus oophorus*-oocyte complex (COC), caused by copious synthesis and deposition of extracellular matrix components, is observed during oocyte maturation *in vitro*. Such changes in the *cumulus* appearance are used as indicative of the oocyte maturation occurrence and contribute to fertilization. The gene expression of proteins associated with the extracellular matrix of the *cumulus* cells could be on the oocyte and/or IVM medium composition influences. The aim of this study was to evaluate, through the RT-PCR technique, the gene expression of hyaluronic acid synthase protein 2 (HAS2), link protein (HAPLN1), connexin 43 (GJA1) and heat shock protein 70 (HSP70-1) in the *cumulus oophorus* cells of bovine immature oocytes exposed and/or vitrified in cryoprotectant solutions and then matured *in vitro*. We compared two vitrification solutions (VS): VS1 = 20% ethylene glycol (EG) + 20% 1,2 propanediol (PRO), and VS2 = 20% EG + 20% DMSO + 0.5 M sucrose. The COCs were obtained from cow ovaries, collected right after slaughter. After the morphological selection, the COCs were allocated into six experimental groups: G1- imature COCs; G2- COCs subjected to IVM; G3- COCs exposed to VS1 and subjected to IVM; G4- imature COCs exposed to VS2 and submitted to IVM; G5- COCs vitrified with VS1 and subjected to IVM; and G6- COCs vitrified with VS2 and submitted to IVM. The IVM was performed in TCM 199 supplemented with oestrus mare serum, at 39°C, under 5% of CO₂ and maximum relative humidity, for 22 to 24 hours. After IVM, five COCs in each group (G2 to G6) were collected, the oocytes were stripped of *cumulus* cells by vortexing and the cells were concentrated by centrifugation and placed in conical tubes of 0.5 ml in liquid nitrogen. In each group COCs were subjected to *in vitro* fertilization and culture under similar conditions from used in MIV. The RNA extraction from samples containing the *cumulus* cells was performed by using TRIzol[®] reagent protocol. Total RNA was re-suspended and the samples were subjected to the specific capture of mRNA using a commercial kit for magnetic separation. The mRNAs were reverse transcribed into cDNA using the RT-PCR technique to evaluate patterns of expression of the four bovine transcripts (*link protein*, *HAS2*, *connexin 43* and *HSP70-1*). The immature oocytes group exposed to VS1 showed a blastocyst rate (30.1%) similar to the control group (38.1%) and significantly higher than the group exposed to VS2, (16.9%, $p = 0.0013$). Significant difference ($p < 0.0001$) was observed between the control group and groups vitrified in the VS1 and VS2, both in the rate of cleavage (respectively, 79.2%, 22.1% and 43.3%) and the development to the blastocyst stage (respectively, 35.6%, 0% and 4.1%). The results of relative abundance obtained from the *cumulus* cells of the five bovine COCs in each experimental group, after three repetitions, showed no significant difference between the groups tested for the transcripts of *link protein* ($p = 0.738$), *HAS2* ($p = 0.772$), *connexin 43* ($p = 0.130$) and *HSP70-1* ($p = 0.333$).

Keywords: *cumulus oophorus*, gene expression, maturation, vitrification

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1	Folículo ovariano	12
3.2	Maturação do oócito	13
3.2.1	Retomada da meiose	14
3.2.2	Maturação citoplasmática	16
3.3	Células do <i>Cumulus oophorus</i>	17
3.3.1	Junções comunicantes	17
3.3.2	Funções do <i>Cumulus oophorus</i> durante a maturação oocitária	20
3.3.2.1	Controle da divisão meiótica	20
3.3.2.2	Maturação citoplasmática do oócito	21
3.3.3	Matriz extracelular do <i>Cumulus oophorus</i>	22
3.4	Vitrificação de oócitos imaturos	25
3.4.1	Proteínas de choque térmico	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	Locais de execução	28
4.2	Produção <i>in vitro</i>	28
4.2.1	Obtenção e seleção dos complexos <i>Cumuli</i> -oócitos (CCOs)	27
4.2.2	Isolamento das células da granulosa e dos oócitos	27
4.2.3	Maturação <i>in vitro</i>	29
4.2.4	Fecundação <i>in vitro</i>	29
4.2.5	Cultivo <i>in vitro</i>	30
4.3	Vitrificação dos CCOs imaturos	30
4.4	Avaliação da expressão gênica	31
4.4.1	Extração do mRNA das células da granulosa	31
4.4.2	Obtenção do cDNA a partir do mRNA	32
4.4.3	Amplificação dos cDNAs das amostras por PCR	32
4.4.4	Análise dos transcritos amplificados	34
4.4.5	Análise estatística	35
5	RESULTADOS	36
4.1.1	Exposição às soluções crioprotetoras	36

5.1.1	Exposição às soluções crioprotetoras	37
5.1.2	Vitrificação dos oócitos imaturos	34
5.2	Expressão dos transcritos	37
6	DISCUSSÃO	42
7	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, um dos grandes desafios nas pesquisas de criobiologia na área de reprodução de animais domésticos continua sendo o desenvolvimento de um método adequado de criopreservação de oócitos imaturos bovinos. A criopreservação pode ser útil para contornar problemas relacionados com variações sazonais que influenciam a disponibilidade de oócitos para produção *in vitro* (PIV).

Obtendo-se uma metodologia que proporcione melhores resultados, pode-se realizar o transporte de oócitos de modo mais eficiente, especialmente quando é necessário percorrer longas distâncias em regiões com infra-estrutura precária, diminuindo custos no processo de produção *in vitro*. Outro aspecto relevante é a criação de bancos de germoplasma, que são fundamentais para manter a biodiversidade das espécies animais. Uma vez estabelecido um protocolo com resultados considerados bons, a transposição do conhecimento para criopreservação de gametas femininos humanos pode ser buscada, tendo em vista que ainda é uma área com pouca experimentação.

A capacidade de criopreservar oócitos de forma bem sucedida tem sido confirmada pela obtenção de animais nascidos vivos a partir de oócitos imaturos bovinos congelados (OTOI *et al.*, 1995; SUZUKI *et al.*, 1996; KUBOTA *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 1998b) ou vitrificados (VIEIRA *et al.*, 2002; ABE *et al.*, 2005).

Um dos principais fatores relacionados à baixa viabilidade oocitária após a vitrificação é o tipo de crioprotetor empregado. O etilenoglicol (EG) e o Dimetil Sulfóxido (DMSO) são dois dos crioprotetores mais utilizados, isoladamente ou em conjunto, na vitrificação de oócitos. Apesar dos resultados obtidos até o momento serem razoáveis, estes crioprotetores apresentam inconvenientes, que limitam uma maior difusão da metodologia (MEZZALIRA *et al.*, 2003). O DMSO é higroscópico e instável, tornando necessário que as soluções crioprotetoras que o utilizam sejam preparadas apenas no momento do uso. Essa característica, além de demandar tempo, requer uma estrutura laboratorial que limita sua utilização no campo. Outros pesquisadores indicam os crioprotetores Propanediol, Glicerol, Etileno Glicol e DMSO e as suas possíveis combinações, como bons candidatos ao emprego na vitrificação de oócitos (ISHIMORI *et al.*, 1992; VAJTA *et al.*, 1998; HUBÁLEK, 2003). No entanto, dados disponíveis sobre estas combinações de crioprotetores ainda são

limitados e indicam baixos resultados de viabilidade após a vitrificação de oócitos imaturos.

Assim como a ação dos crioprotetores empregados na técnica de produção *in vitro*, a eficiência no processo de maturação influi diretamente na taxa de desenvolvimento embrionário, pois é nesse momento que o oócito adquire competência para resolver a meiose e passar pela fecundação.

O processo de maturação promove alterações no núcleo, no citoplasma e na membrana do oócito, de modo a prepará-lo à fecundação. Em cultivo, as células do *cumulus oophorus* melhoram as taxas de maturação oocitária, de modo que oócitos cultivados na ausência dessas células não sofrem crescimento e maturação citoplasmática.

As células da granulosa do *cumulus oophorus* sofrem importantes alterações durante a maturação folicular, sendo que apresentam um nítido aumento de volume, processo conhecido como expansão, tornando-se mucificadas. Essas modificações no aspecto do *cumulus* são uma alteração morfológica utilizada como indicativo da ocorrência de maturação oocitária. As células do *cumulus* sinalizam a maturação do oócito e contribuem também para que ocorra a fecundação.

Através da técnica de RT-PCR (associação da técnica de RT - Transcrição Reversa, do inglês, *reverse transcriptase*, e PCR - Reação de Polimerização em Cadeia, do inglês, *polymerase chain reaction*) pode-se avaliar a expressão gênica de algumas proteínas relacionadas com a maturação de oócitos submetidos a diferentes soluções de criopreservação, na tentativa de elucidar aspectos da maturação que possam aumentar a eficiência do processo de produção *in vitro*. Dessa forma, as proteínas de interesse para o processo de maturação analisadas nesse trabalho foram Ácido Hialurônico Sintase 2 (HAS2), *Link Protein* (HAPLN1), Conexina 43 (GJA1) e HSP70 (proteína de choque térmico, do inglês, *Heat Shock Protein*). A ácido hialurônico sintase 2 (HAS2) é uma enzima relacionada à síntese de um dos componentes dos proteoglicanos, que estão relacionados à organização espacial das células da granulosa, interagindo com o oócito (CAMAIONI *et al.*, 1996; KOBAYASHI, 1999). A *link protein* 1 (HAPLN1) é uma proteína envolvida no processo de expansão das células da granulosa. Moléculas de HAS, outras proteoglicanas e a *link protein* formam um complexo envolvido na organização da matriz extracelular das células da granulosa. Através das junções celulares do tipo comunicante, as células da granulosa trocam íons, segundo mensageiros e

moléculas precursoras, realizando a sinalização celular. Mediante a formação de canais, as células da granulosa trocam informações entre si, e a conexina 43 é uma das proteínas responsáveis pela formação desses canais de troca. A HSP70 (HSP A1A) é uma proteína produzida pelas células como mecanismo de resposta relacionado ao estresse, e a análise de sua expressão gênica poderia ser utilizada como indicativo do impacto que os sistemas de cultivo e as soluções crioprotetoras têm sobre as células da granulosa durante o processo de maturação e vitrificação.

Dessa forma, a otimização da criopreservação de oócitos bovinos, principalmente aqueles imaturos, e a maturação, surgem como etapas importantes na produção *in vitro* buscando mimetizar, através de melhores sistemas de cultivos *in vitro*, as condições que ocorrem *in vivo*.

2 OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho são:

1. Relacionar os eventos físico-químicos da maturação folicular bovina *in vitro*, caracterizada pela mucificação e expansão das células da granulosa do *cumulus-oophorus*, com a expressão gênica das proteínas associadas à matriz extracelular do complexo *cumulus*-oócito (CCO) ácido hialurônico sintetase (HAS) e link protein, bem como da proteína de junção e comunicação celular conexina 43 e da proteína de resposta a condições de estresse HSP70;
2. Verificar a existência de diferenças na expressão gênica destas quatro proteínas, entre as células da granulosa do *cumulus-oophorus*, antes e após a maturação *in vitro*, de oócitos bovinos imaturos submetidos a exposição ou vitrificação em duas soluções crioprotetoras;
3. Determinar a viabilidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro* a partir dos CCOs submetidos a exposição ou vitrificação nas soluções crioprotetoras.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Folículo ovariano

Células germinativas são altamente especializadas em transmitir o genoma às gerações seguintes. Nas espécies animais, a reprodução sexual requer duas divisões meióticas para produzir gametas haplóides (oócitos e espermatozóides), os quais na fecundação dão origem a um zigoto totipotente. Em ambos os sexos, interações entre os gametas em desenvolvimento e as células vizinhas são cruciais para a fertilidade (MATZUK *et al.*, 2002).

Em mamíferos, os oócitos são células grandes, de 20 a 50 μm de diâmetro que se alojam dentro de folículos (SZÖLLÖSI, 1993) e que iniciam a meiose durante a vida fetal. Em fêmeas mamíferas, a meiose ocorre em duas etapas: o primeiro evento ocorre durante a vida fetal, e o segundo, durante o período pré-ovulatório (SIRARD, 2001).

Um folículo ovariano é uma estrutura composta por um oócito associado com células somáticas, chamadas de células foliculares, dispostas como uma camada epitelial ao redor do oócito (PRIEDKALNS & LEISER, 1998).

Driancourt *et al.* (1993) definem foliculogênese como sendo o crescimento de um folículo através de diferentes estágios de desenvolvimento a partir do momento em que emerge da reserva folicular formada durante a oogênese até ser ovulado ou sofrer atresia.

Durante o período fetal, células germinativas primordiais migram do saco vitelino para a gônada em desenvolvimento, para tornarem-se oogônias, as quais proliferam por mitose antes de se diferenciarem em oócitos primários. Neste período, começa a primeira divisão meiótica. Após estes eventos, a meiose é interrompida na fase de diplóteno da prófase I, até o estabelecimento da maturidade sexual. Enquanto os oócitos permanecem parados na meiose I, crescem em tamanho (PRIEDKALNS & LEISER, 1998; ALBERTS *et al.*, 2004). Segundo Szöllösi (1993), os oócitos aumentam de volume em aproximadamente 50 vezes durante a fase de crescimento.

No ovário perinatal de mamíferos, os oócitos se tornam circundados por uma camada única de células somáticas, formando uma população finita de folículos primordiais. As células germinativas diferenciadas, ou oócitos, são encontradas principalmente neste estágio (mais de 95% dos folículos), constituindo a reserva de

folículos do ovário. Os folículos primários são recrutados a partir deste grupo de folículos primordiais, enquanto os oócitos crescem e as células somáticas que os envolvem (células da granulosa) se tornam cubóides e proliferativas. Esta transição é associada a estágios subsequentes de desenvolvimento folicular, e o recrutamento uniforme de folículos primordiais a partir desta reserva é crítico para a continuidade da foliculogênese por toda a vida reprodutiva dos mamíferos. A ativação de alguns folículos primordiais em repouso leva ao desenvolvimento de vários estágios de folículos, como os folículos primários, folículos secundários e folículos antrais. A maior parte dos folículos primários regride antes ou após o nascimento, e somente algumas centenas são ovulados (YANG *et al.*, 1998a; MATZUK *et al.*, 2002).

Folículos secundários são formados por um epitélio estratificado de células da granulosa. Os folículos secundários são caracterizados pelo desenvolvimento de uma espessa camada glicoprotéica, a zona pelúcida, em torno da membrana plasmática do oócito. A zona pelúcida é secretada pelas células da granulosa que estão em contato direto com o oócito e, em parte, pelo próprio oócito (PRIEDKALNS & LEISER, 1998).

Folículos terciários (folículos antrais ou folículos de Graaf) são formados por um oócito primário (ou um oócito secundário imediatamente antes da ovulação na maioria das espécies) envolvido por um epitélio estratificado de células da granulosa; as células da granulosa são circundadas por uma camada de células especializadas, chamadas células da teca folicular. Em torno dessa estrutura, uma cavidade repleta de líquido, o antro, se desenvolve entre as células da granulosa (YANG *et al.*, 1998a).

O crescimento folicular e maturação representam uma série de transformações sequenciais celulares e moleculares de vários componentes do folículo, como o oócito, células da teca e células da granulosa. Estas transformações são governadas por vários fatores intra-ovarianos, intra-foliculares e sinais hormonais, os quais levam à secreção de andrógenos e estrógenos, principalmente o estradiol (HAFEZ, 1993).

3.2 Maturação do oócito

A maturação oocitária consiste de uma série de eventos ordenados que preparam o oócito para que possa ocorrer a fecundação. Esses eventos são complexos e dependem não apenas da correta dinâmica de separação dos

cromossomos, mas também da redistribuição das organelas citoplasmáticas e do acúmulo de mRNA, proteínas e fatores de transcrição necessários para que o processo ocorra. Essas mudanças envolvem alterações nucleares, citoplasmáticas e na membrana do oócito e, embora sejam processos distintos, ocorrem de modo simultâneo (GILCHRIST *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2009).

Na transição do folículo primário para folículo secundário, o oócito adquire a capacidade de retomar a meiose a partir da prófase I, considerando-se este um oócito competente (MATZUK *et al.*, 2002). Segundo Bézard (1997), um oócito é considerado maduro quando está apto a ser fecundado pelo espermatozóide, com formação de pró-núcleo e posterior o desenvolvimento embrionário.

A competência de oócitos obtidos de folículos em crescimento e maturados *in vitro* é menor quando comparada à competência de oócitos maturados *in vivo* (HENDRIKSEN *et al.*, 2000). As condições de maturação têm influência no número de embriões com desenvolvimento até o estágio de blastocisto, sugerindo que modificações nos meios e protocolos de maturação podem ser feitas (CALDER *et al.*, 2003).

3.2.1 Retomada da meiose

A maturação nuclear do oócito é iniciada em folículos de diferentes tamanhos de acordo com a espécie. A maturação só é possível quando uma série de processos preparatórios no folículo tenha sido completada, sendo que o crescimento do oócito e o aumento de volume do fluido folicular são os mais evidentes. Em camundongos, esta fase de crescimento do oócito ocorre durante o desenvolvimento no período pré-antral, e normalmente termina quando o folículo atinge o estágio antral. Em bovinos, o oócito continua crescendo durante o desenvolvimento do folículo antral. Acredita-se que oócitos de bovinos devem atingir um diâmetro crítico de 110 μ m para adquirir competência (YANG *et al.*, 1998a). Segundo Szöllösi (1993), os oócitos devem alcançar aproximadamente 80% do seu tamanho final para tornarem-se aptos a recomeçar a meiose. Segundo Hendriksen *et al.* (2000), o momento em que os oócitos adquirem competência para serem fecundados e se desenvolver *in vitro* até o estágio de blastocisto coincide com o término do seu crescimento e da maior parte da síntese de RNA.

A maturação final do oócito tem início com a maturidade sexual, quando é estimulada por hormônios extra gonadais. Como consequência da liberação do

hormônio folículo estimulante (FSH) e da onda pré-ovulatória do hormônio luteinizante (LH), oócitos que completaram seu crescimento nos folículos reiniciam seu desenvolvimento a partir da meiose I. Dessa forma, os cromossomos recondensam, a vesícula germinal é rompida, e os cromossomos homólogos replicados separam-se na anáfase I dando origem a dois núcleos, cada um contendo a metade do número original de cromossomos. No término da meiose I, o citoplasma é dividido assimetricamente, gerando duas células de diferentes tamanhos, uma pequena, chamada corpúsculo polar, e outra grande, o oócito secundário. Neste momento, cada um dos cromossomos é ainda composto de duas cromátides, que só serão separadas na meiose II, gerando duas células individuais. Após a separação dos cromossomos na anáfase II, após ter ocorrido a fecundação, o citoplasma do oócito secundário se divide novamente originando o oócito maduro e um segundo corpúsculo polar, ambos contendo um número haplóide de cromossomos. Devido às duas divisões citoplasmáticas assimétricas, os oócitos mantêm seu volume, apesar de sofrerem duas divisões celulares (ALBERTS *et al.*, 2004).

A maturação do oócito segue até a metáfase da meiose II permanecendo assim até a fecundação. Na ovulação, o oócito secundário é liberado do ovário e, ocorrendo fecundação, o oócito completa a meiose (HAFEZ, 1993; ALBERTS *et al.*, 2004). A maturação meiótica pode ser induzida experimentalmente em um determinado período, antes que o folículo tenha alcançado seu tamanho definitivo pré-ovulatório.

Quando oócitos em crescimento são removidos dos folículos antes da presença de gonadotrofinas e colocados em meio de cultivo, completam a primeira divisão meiótica e maturam *in vitro*. Porém, mostram pouco potencial para uma fecundação normal e desenvolvimento embrionário (HAFEZ, 1993).

Ainda que a maturação oocitária envolva alterações nucleares e citoplasmáticas, na prática, a avaliação da maturação do oócito utilizada na rotina de produção *in vitro* é dada através da observação da expansão das células do *cumulus* e da emissão do primeiro corpúsculo polar, que indicam que a metáfase II foi atingida (BÉZARD, 1997).

A capacidade dos oócitos alcançarem a metáfase II em cultivo é relacionada às condições de maturação *in vitro* (MIV). A adição de gonadotrofinas e esteróides ao meio de maturação permite a maturação *in vitro* destas estruturas fora do folículo, resultando em um aumento do potencial de fecundação e desenvolvimento

embrionário (SIRARD *et al.*, 2007). O meio de cultivo comumente utilizado para a maturação *in vitro* é o TCM 199 suplementado com soro e hormônios (YANG, 1997). Embora pelo menos 80% dos oócitos bovinos coletados de folículos antrais sofram maturação nuclear espontaneamente em cultivo, são adicionadas gonadotrofinas ao meio de maturação (CALDER *et al.*, 2003). O FSH é adicionado para induzir maturação citoplasmática, expansão do *cumulus* e assim melhorar a eficiência do processo de maturação, mediando a produção de fatores pelas células somáticas que circundam o oócito (GILCHRIST *et al.*, 2004; SIRARD *et al.*, 2007).

3.2.2 Maturação citoplasmática

A maturação nuclear completa não é suficiente para garantir a qualidade do oócito para ser fecundado e promover o crescimento de um embrião. A maturação citoplasmática também deve ser concluída. A migração de grânulos corticais no oolema é um critério utilizado para avaliar a maturação citoplasmática em oócitos de mamíferos (BÉZARD, 1997).

Algumas mudanças ocorrem na organização citoplasmática do oócito durante a maturação, como um desenvolvimento contínuo da reserva lipídica, redução do compartimento de Golgi, rearranjo das mitocôndrias e alinhamento dos grânulos corticais ao longo do oolema. O aumento do compartimento lipídico provavelmente constitui uma reserva energética para o oócito suportar o desenvolvimento após a fecundação até o estágio de blastocisto (DIELEMAN *et al.*, 2002).

A maturação citoplasmática é representada pela aquisição de um fator que permite a descondensação da cromatina espermiática e a substituição de suas proteínas nucleares. Durante a fecundação, as células da granulosa são responsáveis pela aquisição desta capacidade, poucas horas após a descarga de gonadotrofinas (SZÖLLÖSI, 1993).

O desenvolvimento embrionário *in vitro* até o estágio de blastocisto é significativamente menor do que *in vivo*, e isto pode ocorrer devido a deficiências na competência do oócito. Embora grande parte dos oócitos bovinos sofra maturação nuclear espontaneamente, pouco se conhece sobre os requerimentos para uma adequada maturação citoplasmática (CALDER *et al.*, 2003). Essas deficiências podem ser decorrentes das condições de maturação, que possivelmente alteram a expressão de genes, interferindo na aquisição da competência do oócito

(NEMCOVA *et al.*, 2006).

3.3 Células do *cumulus oophorus*

À medida que o folículo cresce e o antro folicular é formado, as células da granulosa se dividem em dois diferentes subtipos com morfologia e função próprias: as células do *cumulus oophorus* que circundam e estão física e metabolicamente, em contato direto com o oócito, e as células murais (ou parietais) da granulosa, que formam a parede do folículo, gerando assim um epitélio estratificado assentado sobre uma membrana basal (GILCHRIST *et al.*, 2004).

As células do *cumulus* e as células da granulosa parietal são diferentes morfologicamente, e existem evidências que o oócito desempenhe um papel decisivo na determinação do destino destas células somáticas, através da secreção de fatores que promovem a sua proliferação (LI *et al.*, 2000).

As células do *cumulus* e as células da granulosa parietal juntamente com o oócito formam um sincício mediado por junções comunicantes, o qual é essencial para o crescimento do oócito. As células da granulosa fornecem nutrientes aos oócitos e os conectam com o ambiente externo (VAN SOOM *et al.*, 2002).

3.3.1 Junções comunicantes

A comunicação entre a maioria das células nos tecidos animais se dá através de canais citoplasmáticos intercelulares que ligam duas membranas celulares. Essa ligação é conhecida como junção celular comunicante (do inglês, *gap junction*). Esses canais que fazem a ligação célula-célula são formados por uma reunião de proteínas conhecidas como conexinas. As junções comunicantes conectam diretamente os compartimentos citoplasmáticos de células vizinhas, permitindo uma rápida troca de íons e metabólitos de até 1kD de tamanho, como segundos-mensageiros (entre eles íons Ca^{2+} e inositol fosfato) e pequenas moléculas importantes para a comunicação intercelular e para respostas coordenadas, fornecidas através de moléculas precursoras de tamanho reduzido (GERSHON *et al.*, 2008).

Ainda nos primeiros estágios foliculares, vários complexos juncionais são encontrados entre o oócito e as células foliculares, sendo que os mais importantes são as junções comunicantes. A comunicação intercelular entre o oócito e as células da granulosa, através destas junções, fornece suporte nutricional para o crescimento

do oócito (BUCCIONE *et al.*, 1990). Os canais de junções comunicantes possuem uma estrutura geral muito similar, sendo que as características de permeabilidade e transporte dependem de modificações pós-transcricionais e da estrutura da conexina (GERSHON *et al.*, 2008).

O nível de comunicação célula a célula, através da conexina, pode ser ajustado por mecanismos que incluem modulação de expressão, regulação da modificação da estrutura e modulação das propriedades do canal de conexina. A mudança na conformação da conexina geralmente ocorre de modo rápido, permitindo assim ajustes no nível de comunicação celular em curto intervalo de tempo. Essa plasticidade de resposta frente aos diferentes estímulos recebidos pelas células favorece a comunicação intercelular. As junções comunicantes aparecem em grande parte das funções relacionadas à reprodução, em especial ao trato reprodutor feminino. No contato direto célula-célula, estas junções parecem ter um papel importante mediando as funções do ovário, como a maturação do oócito (GERSHON *et al.*, 2008).

As conexinas fazem parte de uma família de proteínas transmembrana que formam as junções comunicantes. Conexina 43 (Cx43) é uma proteína de junção comunicante, que está envolvida no crescimento folicular. O mRNA da Cx43 e a proteína estão presentes no complexo *cumulus*-oócito bovino durante a maturação *in vitro* (CALDER *et al.*, 2003).

Segundo Johnson *et al.* (1999), os folículos ovarianos em bovinos expressam as conexinas 26, 32, 37 e 43. Em especial, a conexina 43 está localizada nas células da granulosa do folículo primário e sua expressão tem um aumento gradual à medida que o antro folicular vai se formando, sendo que é altamente expressa em folículos antrais viáveis.

As junções comunicantes, especialmente aquelas formadas por conexina 43, são necessárias para o desenvolvimento e crescimento do oócito. Essa junção se estabelece nos primeiros estágios do folículo persistindo até os últimos estágios do crescimento folicular. Os canais de conexinas servem para transferir para o oócito, aminoácidos e nucleotídeos vindos das células somáticas (EPPIG *et al.*, 1996; TSAI *et al.*, 2003; GERSHON *et al.*, 2008). A associação entre o oócito e as células da granulosa permanece durante as fases de crescimento, diferenciação, maturação e fecundação do oócito. Esta comunicação é crucial tanto para o crescimento e diferenciação do oócito como para as células da granulosa,

permitindo o processo de oogênese (BUCCIONE *et al.*, 1990).

Embora grande quantidade da Cx43 possa ser inativada durante a maturação do oócito, algumas junções comunicantes permanecem funcionais. A maturação de oócitos bovinos é dependente de junções comunicantes funcionais; o bloqueio das junções comunicantes ou a redução de mRNA de Cx43 e da proteína estão associados com uma inibição da maturação do oócito (CALDER *et al.*, 2003). Isso se deve principalmente ao fato de as moléculas produzidas pelo folículo serem essenciais para a aquisição da competência do oócito (GERSHON *et al.*, 2008).

Em diferentes tipos celulares de vários órgãos, as junções comunicantes participam de modo inverso no processo de apoptose, agindo como um fator de sobrevivência. Chang *et al.* (2005) mostraram um aumento de folículos apoptóticos associados com um decréscimo de expressão de conexina 43, no ovário de fêmeas de camundongo, em hiperglicemia aguda e diabetes crônica. Esse estudo associa a apoptose com a queda de expressão de conexina 43, sugerindo que pode haver relação também com o folículo ovariano. Corroborando essa idéia, ovários de fêmeas *knock out* para o gene da conexina 43, possuem um número muito baixo de oócitos (JUNEJA *et al.*, 1999; GERSHON *et al.*, 2008). Esse fenômeno de redução da expressão de conexina 43 em folículos apoptóticos também foi observado em suínos e bovinos (CHANG *et al.*, 2005). Desse modo pressupõe-se que a expressão de conexina 43 é necessária para a sobrevivência das células da granulosa e, por conseguinte, para o oócito.

Em seu trabalho, NEMCOVA *et al.* (2006) afirmaram que a expressão de conexina 43 é importante, conferindo características mais fisiológicas para a produção *in vitro* de embriões bovinos, podendo esse gene servir como marcador de desenvolvimento da competência do oócito.

Estes contatos celulares são importantes durante a existência dos folículos, não somente para o crescimento do oócito, mas também para sua manutenção metabólica. As células em contato direto com o oócito devem ser capazes de responder a certas moléculas secretadas por ele, como por exemplo, a secreção de ácido hialurônico pelo *cumulus* em resposta a sinais moleculares liberados pelo oócito. As junções entre o oócito e as células do *cumulus* são fundamentais, inicialmente para manter o oócito na prófase I da meiose e, após, para estimular o oócito a recomeçar a meiose no momento da ovulação (TANGHE *et al.*, 2002).

O crescimento do oócito não pode ser obtido *in vitro* na ausência das

células foliculares e de junções comunicantes funcionais entre as células do *cumulus* e o oócito. Na sua ausência, não ocorre crescimento. Segundo Szöllösi (1993), a remoção das células do *cumulus* antes da maturação *in vitro* de oócitos bovinos é prejudicial ao processo de maturação.

3.3.2 Funções do *Cumulus oophorus* durante a maturação oocitária

O *cumulus oophorus* totalmente desenvolvido exerce três importantes funções biológicas: 1) antes da ovulação, o *cumulus* controla a maturação do oócito; 2) durante a ovulação, conduz o oócito ao interior do oviduto; e 3) logo após a fecundação, participa dos mecanismos que controlam o acesso do espermatozóide ao oócito. As células do *cumulus* desempenham um importante papel no processo de maturação do oócito por mantê-lo sob bloqueio meiótico, participar na indução da meiose por conduzir o sinal do LH ao oócito e também são responsáveis pela própria maturação citoplasmática do oócito. Estas funções do *cumulus* durante a maturação oocitária podem ser atribuídas a sua rede de junções comunicantes e a suas características metabólicas específicas (TANGHE *et al.*, 2002; VAN SOOM *et al.*, 2002) descritas anteriormente.

3.3.2.1 Controle da divisão meiótica

O bloqueio da meiose de oócitos mamíferos em um estado quiescente ocorre até a célula se tornar competente para responder à ação hormonal e completar espontaneamente o processo de maturação *in vivo* ou em condições de cultivo *in vitro* (CIV). *In vivo*, células da granulosa bovinas são capazes de manter o bloqueio da divisão meiótica em folículos normais até o momento do pico pré-ovulatório de LH (SIRARD & BILODEAU, 1990). O fator responsável pelo bloqueio da meiose tem origem nas células da granulosa, e deve passar através das células do *cumulus* ou ser transformado por elas para se tornar ativo. Várias substâncias poderiam atuar como inibidores da maturação meiótica, como por exemplo as purinas (adenosina e hipoxantina) e o AMP cíclico (SZÖLLÖSI, 1993).

Os níveis de AMP cíclico (cAMP) no oócito desempenham um papel dominante no reinício da meiose. O aumento experimental de cAMP interferiu no processo da retomada da divisão meiótica. A redução dos níveis de cAMP reestabelece as condições para a continuidade da meiose. Células do *cumulus* evidentemente controlam a meiose, visto que os componentes que elevam os níveis

intracelulares de cAMP inibem ou detêm o reinício da meiose em oócitos envolvidos por células do *cumulus*, enquanto que nos oócitos cultivados sem as células do *cumulus* o mesmo não acontece. A retirada de oócitos do meio inibidor de meiose presente nos folículos não é suficiente para a maturação fisiológica destes oócitos (HAFEZ, 1993). É necessário que os oócitos adquiram maturação citoplasmática, processo também influenciado pelas células do *cumulus*.

Alguns mecanismos através dos quais as gonadotrofinas poderiam estimular o reinício da meiose foram propostos. Primeiro, a ruptura ou bloqueio das junções comunicantes entre as células da granulosa e as células do *cumulus* é muito rápida, e precede o reinício da meiose. *In vivo*, a meiose é reiniciada quando as junções comunicantes são rapidamente eliminadas na totalidade do complexo de células da granulosa parietal-células do *cumulus*, interrompendo o transporte do fator inibidor da meiose para o oócito (SZÖLLÖSI, 1993). Segundo, a liberação, no período pré-ovulatório, de LH promove modificações importantes na expressão gênica em células da granulosa e estimula indiretamente a maturação meiótica do oócito e a ovulação de um oócito no estágio de metáfase II, o qual é competente para ser fecundado. Nesta hipótese, as células da granulosa interpretariam o sinal do LH e enviariam um segundo mensageiro para o oócito (TANGHE *et al.*, 2002).

3.3.2.2 Maturação citoplasmática do oócito

Embora ocorra o reinício espontâneo da meiose quando oócitos são incubados *in vitro*, as células do *cumulus* têm um papel fundamental na maturação citoplasmática e desenvolvimento subsequente (KONISHI *et al.*, 1996).

As células do *cumulus* desempenham um importante papel metabólico e protetor durante a maturação citoplasmática. As células da granulosa reduzem cistina a cisteína e promovem a captação de cisteína em oócitos bovinos durante a maturação. Desta forma, os níveis intercelulares de glutatona são aumentados, melhorando a disponibilidade de energia, resultando em maiores taxas de fecundação normal e desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (TANGHE *et al.*, 2002).

As células do *cumulus* também metabolizam glicose produzindo piruvato, que é fornecido ao oócito e, assim, aumenta a disponibilidade energética, melhorando sua qualidade. Oócitos cultivados sem as células da granulosa têm pouca habilidade para metabolizar glicose em comparação com oócitos cultivados

com o *cumulus oophorus* (TANGHE *et al.*, 2002).

3.3.3 Matriz extracelular do *cumulus oophorus*

O ácido hialurônico ou hialuronan (HA) é uma glicosaminoglicana encontrada em matrizes extracelulares, na superfície celular e no citoplasma das células, sendo relacionada com diversos eventos durante o desenvolvimento celular. O principal receptor de HA, presente na superfície celular, na matriz extracelular, é o CD 44. Acredita-se que a interação entre HA e o CD 44 medeia uma série de eventos celulares importantes (YOKOO *et al.*, 2002b).

Nos mamíferos, a onda de LH inicia uma sequência de eventos necessária para que ocorra a ovulação e a maturação do oócito. Um desses eventos é a expansão das células do *cumulus*, ocasionada pela produção de ácido hialurônico e outras proteínas de interação com a matriz extracelular, que origina uma matriz gelatinosa que envolve o complexo *cumulus oophorus*-oócito (SALUSTRI *et al.*, 1999; KIMURA *et al.*, 2002). Essa matriz é altamente hidratada e viscosa e está presente nos espaços intercelulares, resultando em um aumento de 20 a 40 vezes o volume do complexo *cumulus*-oócito (TIRONE *et al.*, 1997; ZHUO & KIMATA, 2001). A formação dessa matriz requer a síntese de HA pelas células do *cumulus*, síntese essa promovida pelos fatores de crescimento produzidos pelo oócito quando da indução pelo LH. A ácido hialurônico sintase 2 (HAS2) é regulada por essa via e sua expressão tem sido relacionada com o desenvolvimento da competência do oócito (DUNNING *et al.*, 2007).

No folículo pré-ovulatório bovino, o *cumulus oophorus* expande quando as células do *cumulus*, que consistem de poucas camadas de células da granulosa, são induzidas a sintetizar grandes quantidades de ácido hialurônico. Esse processo causa a dissociação do complexo *cumulus*-oócito da parede folicular (TIRONE *et al.*, 1997; ZHUO & KIMATA, 2001). Segundo Yokoo *et al.* (2002a), a quantidade de ácido hialurônico sintetizada é estreitamente correlacionada com o grau de expansão do *cumulus*. Schoenfelder & Einspanier (2003) concluem que a enzima hialuronan sintase 2 (HAS2) tem um papel importante durante o processo final de maturação, facilitando a expansão das células do *cumulus*.

O complexo *cumulus*-oócito expandido possui uma matriz complexa contendo o ácido hialurônico organizado em uma rede tridimensional através da qual

ocorrem interações específicas com proteínas e outras macromoléculas da matriz extracelular, responsáveis pela expansão e mucificação do *cumulus oophorus* (CAMAIONI *et al.*, 1996; IRVING-RODGERS & RODGERS, 2005). Segundo Testart (1985), a condição mucosa do *cumulus oophorus* é normalmente correlacionada com a ocorrência de maturação do oócito. Kimura *et al.* (2002) relacionam a expansão das células do *cumulus* do complexo *cumulus oophorus*-oócito (CCO) à modificações no citoesqueleto das células e perda das junções comunicantes.

Fatores produzidos pelas células do *cumulus* durante o período pré-ovulatório são essenciais para que o oócito adquira competência para ser fecundado e para que ocorra um desenvolvimento embrionário adequado. Quando ocorre a produção de gonadotrofinas no período ovulatório, as células do *cumulus* retraem suas projeções citoplasmáticas e perdem seus contatos intercelulares e com o oócito. Entretanto, são logo envolvidas por uma malha protéica de hialuronan que as mantêm associadas ao oócito; assim como o oócito também fica envolvido por essa malha. O acúmulo de hialuronan origina uma matriz deformável de consistência viscosa, elástica e esponjosa que facilita a extrusão do oócito na ovulação. Quando a parede do folículo é rompida, o complexo *cumulus*-oócito se deforma consideravelmente à medida que passa pela camada de células da granulosa, trazendo assim o oócito para fora do folículo, dentro da massa expandida de células do *cumulus*. A matriz extracelular do complexo *cumulus*-oócito ovulado pode representar uma barreira fisiológica para um espermatozóide funcional ou enzimaticamente deficiente. Existe uma correlação entre a habilidade do espermatozóide penetrar a solução viscosa de hialuronan, a motilidade espermática e a eficiência na fecundação (SALUSTI *et al.*, 1999; SCHOENFELDER & EINSPANIER, 2003).

Segundo Richards *et al.* (2008), baseado no fato da matriz extracelular desempenhar um papel crucial na migração celular, é pertinente relacionar que a migração das células do *cumulus* durante a expansão do CCO requer hialuronan e seus fatores de ligação para estabilizar a matriz. Da mesma forma, é possível relacionar este papel ao fato de o espermatozóide, após sofrer a capacitação e a reação acrossômica, liberar hialuronidase que vai despolimerizar e quebrar a matriz em fragmentos menores (entre 10 e 40 kDa) (SCHOENFELDER & EINSPANIER, 2003).

As diversas funções da matriz extracelular, nos tecidos onde se faz

presente, são dependentes das múltiplas interações entre seus componentes. Segundo Kobayashi *et al.* (1999), uma das mais importantes interações que é necessária para manter a integridade e dar suporte às funções da matriz extracelular é a ligação entre as proteoglicanas e HA, formando um agregado protéico. Este agregado é dependente da *link protein* ou HAPLN1 (do inglês, *hyaluronan and proteoglycan link ptotein 1*), uma glicoproteína de ligação encontrada em matrizes extracelulares e também em cartilagens; a ligação da *link protein* tanto com os monômeros de proteoglicanas quanto com os polímeros de HA fortalece e estabiliza o agregado (SPICER *et al.*, 2003).

Kobayashi *et al.* (1999), através de técnicas de imuno-histoquímica, detectaram a presença de *link protein* principalmente na matriz extracelular do *cumulus*. A presença desta proteína não foi observada após tratamento com hialuronidase, sugerindo sua ligação a moléculas de ácido hialurônico. Sun *et al.* (1999) chegaram a conclusão de que as células do *cumulus* depositam *link protein* na matriz extracelular e que ela é liberada dos tecidos e das células do *cumulus* em cultivo pela digestão por hialuronidase. Isso sugere que a proteína não está presa nas membranas celulares que delimitam o espaço extracelular, mas sim ancorada ao agregado de proteoglicanas e HA.

Além das contribuições das células do *cumulus oophorus* durante a maturação, elas também previnem alterações do oócito prejudiciais à fecundação. Em camundongos, a remoção do *cumulus oophorus* durante a maturação do oócito resultou em um aumento da resistência da zona pelúcida à digestão proteolítica e penetração espermática (VAN SOOM *et al.*, 2002).

A expansão do complexo *cumulus*-oócito também pode facilitar a extrusão do oócito através da parede folicular rompida durante a ovulação, e auxiliar sua captura pela fímbria do oviduto. Além disso, o ácido hialurônico e proteoglicanas, como o dermatan sulfato, podem contribuir para o sucesso da fecundação do oócito através da estabilização da zona pelúcida, e por estimular a ativação e motilidade espermática (TIRONE *et al.*, 1997).

Chen *et al.* (1993) correlacionaram a eficiência da fecundação com a quantidade e qualidade da expansão das células do *cumulus*, verificando também que a perda ou remoção mecânica das células do *cumulus* foi relacionada com diminuição das taxas de fecundação *in vitro* (FIV).

3.4 Vitrificação de oócitos imaturos

A definição física de vitrificação é a solidificação de uma solução, a baixas temperaturas em um estado vítreo, sem a formação de cristais de gelo. A utilização de soluções crioprotetoras concentradas diminui a formação de cristais de gelo através do aumento da viscosidade da solução a altas taxas de resfriamento e evitam a nucleação e o crescimento dos núcleos de gelo (VAJTA, 2000; CHECURA & SEIDEL Jr., 2007).

Durante a vitrificação a solução adquire um estado amorfo semelhante ao vidro, de modo que os movimentos moleculares são significativamente diminuídos. Dessa forma é mantida a distribuição iônica e molecular normal das células, como no estado líquido (RALL, 1987)

A estratégia da vitrificação é diferente daquela do congelamento à taxas de resfriamento mais baixas. Uma baixa taxa de resfriamento procura manter um delicado balanço entre vários fatores, que podem resultar em danos às células, como por exemplo, formação de cristais de gelo, dano osmótico, efeito tóxico dos crioprotetores, concentração dos eletrólitos intracelulares e alteração das organelas, citoesqueleto e contatos célula-célula, enquanto que a vitrificação elimina a formação dos cristais de gelo. As altas taxas de resfriamento utilizadas na vitrificação diminuem também os danos à estrutura e movimento dos lipídios presentes nas membranas, através da passagem rápida pela zona de temperatura que provoca danos às células, entre +15°C e -5°C (VAJTA, 2000). Os protocolos de vitrificação são relativamente simples, permitindo que a amostra (células ou tecidos) seja colocada diretamente em contato com a solução crioprotetora e depois seja imersa diretamente em nitrogênio líquido (LIBERMANN *et al.*, 2002).

A criopreservação de oócitos bovinos é uma biotécnica que permite o armazenamento de gametas para preservação de germoplasma. É um benefício para os programas de melhoramento animal permitindo a maior participação da fêmea e de biotécnicas que utilizam o oócito, como a clonagem por transferência nuclear. Além disso, a possibilidade de criopreservar oócitos imaturos bovinos com sucesso, permite seu armazenamento após sua remoção do ovário, eliminando a necessidade de um aparato para fecundação *in vitro* em local próximo após o procedimento de obtenção do oócito. A preservação de oócitos tem sido realizada em diversas espécies de mamíferos. Entretanto, apesar de alguns trabalhos com resultados satisfatórios, a eficiência continua muito baixa (YAMADA *et al.*, 2007;

DIEZ *et al.*, 2005).

Oócitos imaturos bovinos são sensíveis a temperaturas entre 4 e 0°C. Para minimizar a exposição dos oócitos a baixas temperaturas, as técnicas de criopreservação com altas taxas de resfriamento têm sido desenvolvidas de modo que o oócito passe de modo rápido pelo intervalo de temperatura que provoca danos. A vitrificação é um procedimento que diminui o período de exposição à solução crioprotetora, através da colocação imediata do material no nitrogênio líquido, alcançando altas taxas de resfriamento (CETIN & BASTAN, 2006; YAMADA *et al.*, 2007), assim, diminuindo os danos provocados pelo resfriamento (CHECURA & SEIDEL Jr., 2007). Esse processo resulta na solidificação do material sem a formação de gelo (estado vítreo), minimizando os danos ao citoesqueleto do oócito. Entretanto para esse estado, é necessário submeter as células à soluções onde a concentração de crioprotetores variam de 5 a 7 M (VAJTA, 2000).

Apesar da importância da penetração das soluções crioprotetoras para evitar a formação de gelo, a grande concentração dos crioprotetores empregada nas soluções de vitrificação pode ser tóxica e provocar danos osmóticos às células quando utilizada em temperaturas incorretas (RABIN *et al.*, 2006; YAMADA *et al.*, 2007). Os danos provocados pelo resfriamento podem afetar a membrana plasmática de modo irreversível (CETIN & BASTAN, 2006). Alguns trabalhos propõem, como forma de reduzir a toxicidade, o uso de crioprotetores com ação menos tóxica nas soluções de vitrificação, associação de diferentes crioprotetores e diminuição do tempo de exposição à solução de vitrificação à temperaturas acima de 0°C (VAJTA, 2000; YAMADA *et al.*, 2007).

3.4.1 Proteínas de choque térmico

Em todos os tipos celulares, o processo de criopreservação afeta tanto a estrutura celular quanto vias metabólicas, principalmente o sistema antioxidante. Dessa forma a criopreservação representa um grande estresse para a célula, que tenta manter a sua homeostase produzindo algumas moléculas com capacidade protetora, em especial as proteínas de choque térmico (ou HSP, do inglês, *Heat Shock Protein*). As HSPs protegem as células de danos preservando sua viabilidade, permitindo um rápido re-estabelecimento das atividades normais, até que o dano cesse (TIRELLI *et al.*, 2005). Dessa forma as células possuem uma capacidade para se adaptar às mudanças nas condições do ambiente *in vivo* e *in vitro* (EDWARDS *et*

al., 2001).

Embora inicialmente relacionadas apenas ao choque térmico, as proteínas de choque térmico são produzidas pelas células em razão de diferentes agentes ambientais, como metais pesados, inibidores do transporte de elétrons, inibidores da síntese protéica, hormônios (EDWARDS *et al.*, 2001).

Características morfológicas como aspecto das células do *cumulus* e do citoplasma, tamanho do oócito e extrusão do corpúsculo polar, são relacionadas com a habilidade do oócito em ser fecundado e seguir até o estágio de blastocisto. Segundo Sagirkaya *et al.* (2007), estes não são critérios suficientes para avaliar o potencial de desenvolvimento.

A abundância relativa de transcritos de alguns genes é afetada pelos meios de cultivo e tipos de suplementos protéicos, influenciando no desenvolvimento embrionário. Na metodologia de produção *in vitro* (PIV) são utilizados soro e/ou co-cultivo com células somáticas devido a limitada compreensão dos processos envolvidos com o metabolismo do oócito e do embrião (MASTROMONACO *et al.*, 2004).

O soro tem sido utilizado como a principal fonte protéica nos meios de cultivo. Entretanto, apresenta variações nos resultados de um lote para outro, em razão da variância dos componentes do soro, como aminoácidos, hormônios, citocinas, fatores de crescimento. Essas variações podem provocar alterações nos perfis de expressão de alguns transcritos, como a HSP70 (SAGIRKAYA *et al.*, 2007), como resposta das células.

Kawarsky & King (2001) observaram a presença de transcritos de HSP70 desde oócitos imaturos até o estágio de blastocisto expandido. A avaliação da expressão destes transcritos de HSP70 poderia ser utilizada como indicador do estresse térmico causado pela criopreservação em células da granulosa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais de execução

Todas as etapas de coleta e seleção dos complexos *cumuli*-oócitos (CCOs), vitrificação dos CCOs e produção *in vitro* (maturação, fecundação e cultivo) foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal Prof. Assis Roberto de Bem, no Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) na Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) em Lages, Santa Catarina.

As etapas referentes ao processamento do material e avaliação da expressão gênica foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

4.2 Produção *in vitro*

4.2.1 Obtenção e seleção dos complexos *cumuli*-oócitos (CCOs)

Os ovários foram coletados em abatedouro no município de Lages e transportados em solução salina tamponada com fosfato à temperatura de 24 a 30 °C, adicionado de penicilina G potássica (Sigma®, P-4686) e sulfato de estreptomicina (Sigma®, S-1277). Entre cinco a oito horas após o início do abate, os folículos que apresentavam diâmetro entre dois e oito mm, foram puncionados com uma agulha de 19G (Becton Dickinson®) conectado a um tubo de ensaio, ligado a uma bomba de vácuo com pressão suficiente para aspirar 20ml de líquido/min. Em seguida, o sedimento do fundo dos tubos foi transferido para placas quadriculadas para busca das estruturas sob estereomicroscópio. A seleção dos CCOs foi realizada em líquido folicular centrifugado (Lemhkuł *et al.*, 2002), sendo utilizados apenas CCOs que apresentassem oócitos com citoplasma homogêneo e completamente envoltos por células do *cumulus* compactas.

4.2.2 Isolamento das células da granulosa e dos oócitos

Após a seleção morfológica, grupos de 5 ou de 25 CCOs que apresentavam camadas compactas de células do *cumulus* e cujos oócitos mostrassem citoplasma homogêneo, foram selecionados e distribuídos em 6 grupos experimentais: **G1 (ou AOC)** – 5 CCOs não submetidos a maturação; **G2 (ou AMC)** – 25 CCOs submetidos à maturação *in vitro* (MIV); **G3 (B1EC)** – 25 CCOs expostos à solução de vitrificação

1 e submetidos à MIV; **G4 (B2EC)** – 25 CCOs expostos à solução de vitrificação 2 e submetidos à MIV; **G5 (A1VC)** – 25 CCOs vitrificados com a solução 1, reaquecidos após 24 horas e submetidos à MIV; **G6 (A2VC)** – 25 CCOs vitrificados com a solução 2, reaquecidos após 24 horas e submetidos à MIV.

Os 5 CCOs do **G1 (ou AOC)** foram submetidos ao desnudamento mecânico em agitador de tubos. Em seguida, os óocitos foram recuperados e as células concentradas por centrifugação antes do acondicionamento em tubos cônicos de microcentrifuga de 0,5 ml para armazenamento em botijão criogênico visando a preservação do mRNA das células.

Os 25 CCOs de cada um dos demais grupos (**G2 a G6**), foram submetidos aos tratamentos específicos e, após a maturação *in vitro*, foram coletados 5 CCOs de cada grupo para serem desnudados e armazenados em nitrogênio líquido de forma idêntica aos CCOs imaturos do **G1**.

4.2.3 Maturação *in vitro*

Após a seleção e a realização do tratamento específico, os CCOs dos grupos **G2 a G6** foram transferidos para o meio de maturação (Meio TCM199 com sais de Earle, adicionado de 5,96mg/ml de Hepes [Sigma H 6147]; 2,2mg/ml de NaHCO₃; 2,2µg/ml de piruvato de sódio; 0,01UI de rFSH/ml [Serono; L1930300]; 0,5µg/ml LHb [USDA; AFP-11743-B] e 10% de soro de égua em estro [SEE]), para incubação a 39°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e máxima umidade relativa, onde permaneceram por 22 a 24 horas.

4.2.4 Fecundação *in vitro*

Para a fecundação, foram selecionados espermatozóides a partir de sêmen congelado, proveniente de um touro com reconhecida eficiência na produção *in vitro* de embriões. O sêmen foi descongelado em banho-maria a 37°C por 30 segundos, sendo transferido para um tubo de reação de 1,5ml. Após homogeneização, foi retirada uma amostra de 100µl para deposição sob 1,0ml de meio Talp-SPERM (Parrish *et al.*, 1985), colocados em um tubo de vidro de 6ml com tampa. Dois tubos foram mantidos a 37°C em estufa durante uma hora. Após a migração dos espermatozóides (*swim-up*), foram aspirados 850 µl de meio e feita a determinação da concentração em câmara de Neubauer.

Os CCOs maturados foram transferidos para os respectivos poços da placa de fecundação, contendo 400µl de meio Talp-FERT (Parrish *et al.*, 1985) adicionado de 30 µg/ml de heparina (Sigma H 3393, 183 USP/mg); 0,72µg/ml de penicilamina; 0,26µg/mL de hipotaurina; e 0,04µg/mL de epinefrina.

A inseminação (dia zero=D0), foi obtida mediante a deposição de 20µl de meio com uma concentração final de 1×10^6 espermatozoides/ml, correspondente a dose inseminante a ser adicionada a cada poço da placa. Para a fecundação, os CCOs foram incubados com os espermatozoides por 18–22 horas, nas mesmas condições de cultivo descritas para a maturação.

4.2.5 Cultivo *in vitro*

Após a fecundação, as estruturas foram transferidas do meio Talp-FERT para tubos de ensaio com meio de manutenção, nos quais foi realizada a remoção das células do *cumulus oophorus*, mediante 60 segundos de agitação mecânica em agitador de tubos. Após serem recuperadas e lavadas em meio novo, as estruturas foram transferidas para os respectivos poços da placa de cultivo, contendo 400µl de meio SOFaaci (HOLM *et al.*, 1999), sob óleo mineral (Sigma, M 8410). Após serem centrifugadas e lavadas por três vezes, uma amostra de células do *cumulus oophorus* foi adicionada aos poços de cultivo para condicionamento do meio. A incubação foi realizada a 39°C em estufa de cultivo com atmosfera de 5% CO₂ até a avaliação da taxa de clivagem 48 horas após a inseminação (D2), quando foram removidas as estruturas não clivadas. Após isso, a placa de cultivo foi acondicionada em uma bolsa de plástico não permeável a gases (VAJTA *et al.*, 1997) para incubação com atmosfera constante de 5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂, máxima umidade relativa e temperatura de 39°C durante o restante do cultivo.

Foram realizadas avaliações durante o cultivo *in vitro*, sendo a primeira realizada 48 horas após a inseminação (dia 2 = D2), considerando viáveis os zigotos que apresentaram clivagem. Uma segunda avaliação foi realizada para verificar os embriões que atingiram o estágio de blastocisto no dia 7 (D7) e dia 8 (D8) após a inseminação.

4.3 Vitrificação dos CCOs

Os CCOs imaturos foram vitrificados pela exposição ao nitrogênio líquido

em tubos de vidro manualmente estirados. A viabilidade foi avaliada pela capacidade de desenvolvimento dos embriões *in vitro* até o estágio de blastocisto. Após serem selecionados, os CCOs foram homoganeamente distribuídos em três tratamentos: tratamento 1 (exposição à solução de vitrificação), tratamento 2 (vitrificação) e controle (não vitrificado).

Foram comparadas duas soluções de vitrificação distintas, constituídas por solução de vitrificação 1 (SV1): etileno glicol (EG) + 1,2 propanediol (PRO) ou solução de vitrificação 2 (SV2): EG + dimetil sulfóxido (DMSO). Nos tratamentos, os CCOs foram inicialmente expostos a solução de equilíbrio 1 (SE1 = 10% EG + 10% PRO em meio de manipulação) ou a solução de equilíbrio 2 (SE2 = 10% EG + 10% DMSO em meio de manipulação). Após 30 segundos de exposição a uma das SE, os CCOs foram expostos a uma das soluções de vitrificação (SV1 = 20% de EG + 20% PRO em meio de manipulação, ou SV2 = 20% de EG + 20% DMSO + 0,5M de sacarose em meio de manipulação), por 25 segundos. Após este período de exposição os CCOs foram depositados na solução de remoção de crioprotetores (tratamento exposição) ou envasados e mergulhados obliquamente no nitrogênio líquido (tratamento vitrificação).

A remoção dos crioprotetores foi realizada mediante imersão dos CCOs do tratamento exposição ou da palheta (tratamento vitrificação) em uma solução de TCM Hepes + 20% de SEE + 0,3 M de sacarose, por cinco minutos, seguida da passagem em uma solução de TCM Hepes + 20% de SEE + 0,16 M de sacarose, por cinco minutos. Em seguida os CCOs eram colocados em meio de manutenção e selecionados de acordo com o grupo experimental para a maturação *in vitro*.

4.4 Avaliação da expressão gênica

4.4.1 Extração do mRNA das células da granulosa

A extração do mRNA das amostras contendo as células do *cumulus oophorus* de cinco CCOs foi realizada em duas etapas. Para a extração do RNA total de cada um dos seis grupos foi utilizado o reagente TRIzol[®] (Invitrogen, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

O RNA total foi re-suspenso em 30 µl de água ultra-pura livre de RNase. A cada amostra de RNA das células do *cumulus* foi adicionado 20 pg de mRNA de alfa-hemoglobina (HBA) de coelho (BRL, USA) como um controle interno da extração de mRNA das amostras. As amostras foram submetidas à captação

específica do mRNA utilizando-se um “kit” comercial de separação magnética (Dynabeads[®] mRNA[™] DIRECT Micro Kit, DYNAL, Noruega), de acordo com as instruções do fabricante. No final do protocolo de separação magnética, o mRNA foi re-suspenso em 8,5 µl de água ultra-pura livre de RNase. Um tubo contendo apenas 20 pg de mRNA de alfa-hemoglobina (HBA) de coelho re-suspenso em água ultra-pura livre de RNase em um volume final de 9µl, foi preparado como um controle da captação de mRNA pela separação magnética.

4.4.2 Obtenção do cDNA a partir do mRNA

Os mRNAs foram transcritos reversamente em cDNA em uma solução contendo 4 µl de tampão 5X First Strand Buffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; Invitrogen); 2 µl de DTT (0,1 M; Invitrogen); 1µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (0,5 µg/ml; Invitrogen); 2 µl de solução com 2,5 mM de cada dNTP (Invitrogen); 2 µl de RNaseOUT[™] Recombinant Ribonuclease Inhibitor (10 U/µl; Invitrogen); e 100 U de enzima M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/µl; Invitrogen) em um volume final de 20 µl, em tubos cônicos de polipropileno de 0,5 ml. A mistura foi coberta com óleo mineral e a reação de transcrição reversa (RT) realizada à 37°C por 60 minutos seguida de aquecimento a 95°C por 10 minutos. Ao final da reação de transcrição reversa, as amostras de cDNA das células do *cumulus* foram diluídas para um volume final de 50µl, com água ultra-pura livre de RNase

4.4.3 Amplificação dos cDNAs das amostras por PCR

Para a amplificação do cDNA foi estabelecido um valor padrão chamado de equivalente-células do *cumulus oophorus* (equivalente cel), como forma de padronizar as quantidades de cDNA inicial na PCR. Cada amostra continha células do *cumulus* de 5 CCOs em 50 µl, portanto, cada µl do cDNA corresponderia a 0,1 equivalente cel.

Foram avaliados os padrões de expressão de quatro transcritos de bovinos: 1) *conexina 43* ou *GJA1* (do inglês, *gap junction protein, alpha 1, 43kDa*); 2) *ácido hialurônico sintase 2* (*HAS2*, do inglês, *hyaluronan synthase 2*); 3) *link protein 1* ou *HAPLN1* (do inglês, *hyaluronan and proteoglycan link protein 1*); e 4) a *HSP70-1* ou *HSPA1A* (do inglês, *heat shock 70 kD protein 1* ou *heat shock 70kDa protein 1A*).

Para o processo de otimização algumas variantes foram alteradas, buscando-se chegar a um padrão de expressão uniforme dos transcritos. Diferentes concentrações das amostras de cDNA a serem utilizadas em cada tubo de reação foram testadas durante a otimização, chegando-se aos valores de cDNA [1,2 equivalente cel para *link protein 1* (*HAPLN1*); 0,2 equivalente cel para *HAS2*; 0,1 equivalente cel para *conexina 43* (*GJA1*); 0,3 equivalente cel para *HSP70-1*; e 0,25 equivalente cel para *alfa-hemoglobina de coelho* (*HBA*)] e ao número de ciclos de PCR (38 ciclos de amplificação para *link protein 1* e 33 ciclos para os demais transcritos) utilizados para os experimentos.

Os oligonucleotídeos ou “primers” foram desenhados de acordo com as sequências descritas na literatura, sintetizados sob encomenda (Invitrogen) e são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1. Sequência de bases dos oligonucleotídeos utilizados na técnica de RT-PCR para a amplificação de cDNA.

Genes	Acesso no GenBank	Sequência dos “primers”	Produto amplificado (pares de base)
<i>Conexina 43</i>	NM_174068	5' GGG AAA GAG CGA TCC TTA CCA CAC TAC CAC 3' CCA CCT CCA ATG AAA CAA AAT GAA CAC CTA	516pb
<i>HAS2</i>	NM_174079	5' GCT TGA CCC AGC ATC ATC TGT GG 3' CTG GTT TAA CCA TCT GAG ATA TT	403pb
<i>HAPLN1</i>	NM_174288	5' GGT CTG TGC AAT ATC CCA TC 3' CCC ACT TTA GCA ATC TGA GC	232pb
<i>HSP70-1</i>	NM_174550	5' AAG GTG CTG GAC AAG TGC CAG GAG GTG ATT 3' ACT TGG AAG TAA ACA GAA ACG GGT GAA AAA	488pb
<i>HBA</i>	NM_001082389	5' GCA GCC ACG GTG GCG AGT AT 3' GTG GGA CAG GAG CTT GAA AT	257pb

Para cada par de “primers” foi necessária a otimização da concentração a ser utilizada na PCR, bem como a quantidade inicial de cDNA (equivalente cel de cDNA) a ser adicionado nas reações de amplificação e o número de ciclos de amplificação dos fragmentos a serem avaliados.

As concentrações de “primer” utilizadas variaram de acordo com as sequências de cDNA a serem amplificadas. Para *conexina 43*, *HAS2* e *HSP70-1* e *alfa-globina* (*HBA*) de coelho, foram utilizados 10 pmoles/reação de cada “primer” (senso e anti-senso). Para a *link protein 1* (*HAPLN1*) de bovino foram utilizados 20 pmoles/reação de cada “primer” (senso e anti-senso).

Após a otimização chegou-se aos seguintes valores de cDNA bovino a serem utilizados na PCR: 1,2 equivalente cel (12 μ l) para link protein 1; 0,2 equivalente cel (2 μ l) para HAS2; 0,1 equivalente cel (1 μ l) para conexina 43; 0,3 equivalente cel (3 μ l) para HSP70-1; e 0,25 equivalente cel (2,5 μ l) para alfa-hemoglobina de coelho (HBA). Para a amostra de cDNA de alfa-hemoglobina de coelho, utilizada como controle da separação magnética do mRNA, utilizou-se o equivalente a 1pg (1 μ l) do mRNA inicial submetido a reação de transcrição reversa.

A PCR foi realizada em tubos de 0,5 ml contendo: 2 μ l de tampão 10X PCR Buffer (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl; Invitrogen); 0,6 μ l de $MgCl_2$ (50 mM, Invitrogen); 1 μ l da solução de 10 mM de dNTP (Invitrogen); 0,2 μ l de enzima Platinum[®] Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l; Invitrogen); 1 μ l (10 ou 20 pmoles/ μ l) de cada oligonucleotídeo ou "primer" (senso e anti-senso); 0,1 a 1,2 equivalente cel (1 μ l a 12 μ l) de cDNA das amostras de células bovinas do *cumulus* ou 1 pg (1pg/ μ l) de cDNA da amostra de alfa-globina de coelho; e água ultra-pura livre de DNase em quantidade suficiente para completar um volume final de 20 μ l. A mistura foi coberta com óleo mineral e os tubos acondicionados no termociclador para a realização da PCR.

Os tubos contendo as amostras foram submetidos a uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, seguida de 33 ou 38 ciclos de amplificação de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 90 segundos, e um ciclo de extensão final de 72°C por 3 minutos. Foram utilizados 38 ciclos de amplificação para link protein 1 e 33 ciclos para os demais fragmentos.

4.4.4 Análise dos transcritos amplificados

O volume de 20 μ l da amostra contendo o DNA amplificado por PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% (GIBCO BRL[®]) em tampão TBE 0,5X (Sambrook *et al.*, 1989) contendo 0,5 μ g/ml de brometo de etídio (Sigma). Após a realização da eletroforese o gel foi fotografado com câmera digital (DC40 camera, Kodak, EUA) e analisado com o programa Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, USA). O programa também foi utilizado para analisar a densidade óptica das bandas obtidas no gel, comparando-se a quantidade de *pixels* de cada gene.

4.4.5 Análise estatística

Os resultados de viabilidade embrionária obtidos foram analisados utilizando o teste de Qui-quadrado e teste exato de Fisher. Os resultados de abundância relativa dos transcritos de *HAPLN1*, *HAS2*, *conexina 43* e *HSP70-1* foram analisados usando o pacote de programa SPSS (Inc., Chicago, IL., USA), pelo teste ANOVA complementado pelo teste de Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Viabilidade embrionária

5.1.1 Exposição às soluções crioprotetoras

Os dados de viabilidade embrionária obtidos no experimento de exposição dos CCOs às soluções crioprotetoras estão agrupados na Tabela 2. Houve diferença significativa ($p=0,0016$) entre as taxas de clivagem observadas no grupo controle em relação às obtidas nos grupos expostos as soluções de vitrificação SV1 (EG + PRO) e SV2 (EG + DMSO).

Em relação às taxas de blastocitos obtidos, o grupo exposto a SV1 apresentou resultado de viabilidade embrionária semelhante ao grupo controle e significativamente superior às taxas de blastocisto obtidas no grupo exposto a SV2, tanto no D7 ($p=0,0013$) como D7 + D8 ($p=0,0008$).

Tabela 2. Taxa de clivagem e de desenvolvimento até o estágio de blastocisto de oócitos bovinos expostos às soluções crioprotetoras SV1 (EG + PRO) e SV2 (EG + DMSO).

Grupos	Número de oócitos	Clivagem		Blastocistos			
				D7		D7 + D8	
		N	(%)	N	(%)	N	(%)
Controle	118	96 ^a	(81,3)	45 ^a	(38,1)	51 ^a	(43,2)
SV1	116	79 ^b	(68,1)	35 ^a	(30,1)	38 ^a	(32,7)
SV2	118	71 ^b	(60,1)	20 ^b	(16,9)	24 ^b	(20,3)

a, b, c: números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente pelo teste do Qui-quadrado ($p<0,01$).

5.1.2 Vitrificação dos oócitos imaturos

Os dados referentes ao número de oócitos utilizados, taxas de clivagem e de blastocistos obtidos no experimento de vitrificação, são apresentados na Tabela 3. Verificou-se que houve diferença significativa ($p<0,0001$) entre o grupo controle e os grupos vitrificados nas soluções SV1 e SV2, tanto na taxa de clivagem quanto no desenvolvimento até o estágio de blastocisto no D7 e no D7 + D8.

Tabela 3. Taxa de clivagem e de desenvolvimento até o estágio de blastocisto de oócitos bovinos submetidos a vitrificação nas soluções crioprotetoras SV1 (EG + PRO) e SV2 (EG + DMSO).

Grupos	Número de oócitos	Clivagem		Blastocistos			
				D7		D7 + D8	
		N	(%)	N	(%)	N	(%)
Controle	241	191 ^a	(79,2)	86 ^a	(35,6)	94 ^a	(39,0)
SV1	212	47 ^c	(22,1)	0 ^c	(0)	1 ^c	(0,4)
SV2	217	94 ^b	(43,3)	9 ^b	(4,1)	10 ^b	(4,6)

a, b, c: números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente pelo teste de Fisher ($p < 0,0001$).

5.2 Expressão dos Transcritos

Durante a realização dos experimentos, foi necessária a otimização das condições do ensaio de PCR. As quantidades de cDNA, temperatura de anelamento e número de ciclos tiveram que ser ajustados para se chegar a condições que permitissem uma avaliação da abundância relativa dos transcritos.

A Figura 1 é representativa desse processo de otimização necessário para adequar as condições de PCR. As condições inicialmente testadas no experimento para a reação de amplificação são mostradas na Figura 1A, onde foi utilizada uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, seguidos de 30 ciclos de amplificação de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 90 segundos, e um ciclo de extensão final de 72°C por 3 minutos, para os transcritos de *HAS2*, *HSP70-1* e *conexina 43*, e 35 ciclos para *HAPLN1*. A Figura 1B mostra a modificação na intensidade de amplificação dos transcritos após a alteração no número de ciclos utilizados na amplificação (38 ciclos para *link protein 1* e 33 ciclos para os demais transcritos).

Com as condições do ensaio de PCR estabelecidas, foi possível executar os experimentos com a obtenção de resultados que permitissem a visualização dos fragmentos amplificados de forma satisfatória.

A análise das fotografias realizadas dos géis após a eletroforese, através da medição da densidade óptica de cada fragmento medida em *pixels*, permitiu estabelecer um valor de intensidade para cada amostra, relacionada com a

expressão dos transcritos. A abundância relativa de cada amostra foi obtida pela razão do valor da densidade óptica de cada transcrito bovino pelo valor da densidade óptica do transcrito de alfa-globina de coelho correspondente.

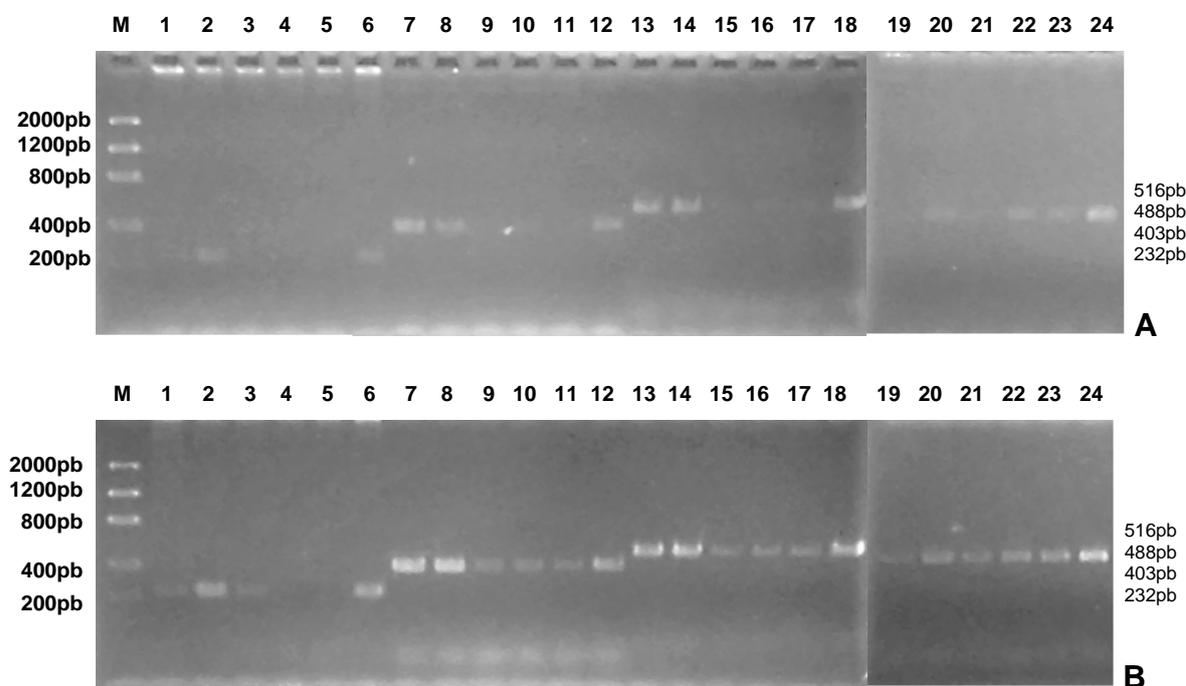


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (0,5µg/ml), mostrando os produtos de amplificação do cDNA de células bovinas de 5 complexos oócito-*cumulus oophorus* (CCOs) obtidas a partir dos diferentes grupos experimentais: AOC - CCOs imaturos (amostras 1, 7, 13 e 19); AMC - CCOs submetidos à maturação *in vitro* (amostras 2, 8, 14 e 20); B1EC - CCOs maturados após exposição à solução de vitrificação 1 (amostras 3, 9, 15 e 21); B2EC - CCOs maturados após exposição à solução de vitrificação 2 (amostras 4, 10, 16 e 22); A1VC - CCOs maturados após a vitrificação na solução 1 (amostras 5, 11, 17 e 23); A2VC - CCOs maturados após a vitrificação na solução 2 (amostras 6, 12, 18 e 24). M - Padrão de peso molecular (470 ng, Low DNA Mass Ladder, Invitrogen™); Amostras 1 a 6 - amplificação dos transcritos de *HAPLN1* (232pb); Amostras 7 a 12 - amplificação dos transcritos de *HAS2* (403pb); Amostras 13 a 18 – amplificação dos transcritos de *conexina 43* (516pb); Amostras 19 a 24 – amplificação dos transcritos de *HSP70-1* (488pb). **A** - PCR utilizando de 30 ciclos de amplificação para os transcritos de *HAS2*, *HSP70-1* e *conexina 43*, e 35 ciclos para *HAPLN1*. **B** - PCR utilizando de 33 ciclos de amplificação para os transcritos de *HAS2*, *HSP70-1* e *conexina 43*, e 38 ciclos para *HAPLN1*.

A média e o desvio padrão dos valores de abundância relativa dos transcritos obtidos a partir das células do *cumulus oophorus* de 5 CCOs bovinos em cada um dos seis grupos experimentais, após três repetições, são apresentados na Figura 2. Entre os diferentes grupos de CCOs testados não foi observada diferença significativa na abundância relativa dos transcritos de *link protein* ($p=0,738$), *HAS2* ($p=0,772$), *conexina 43* ($p=0,130$) e *HSP70-1* ($p=0,333$).

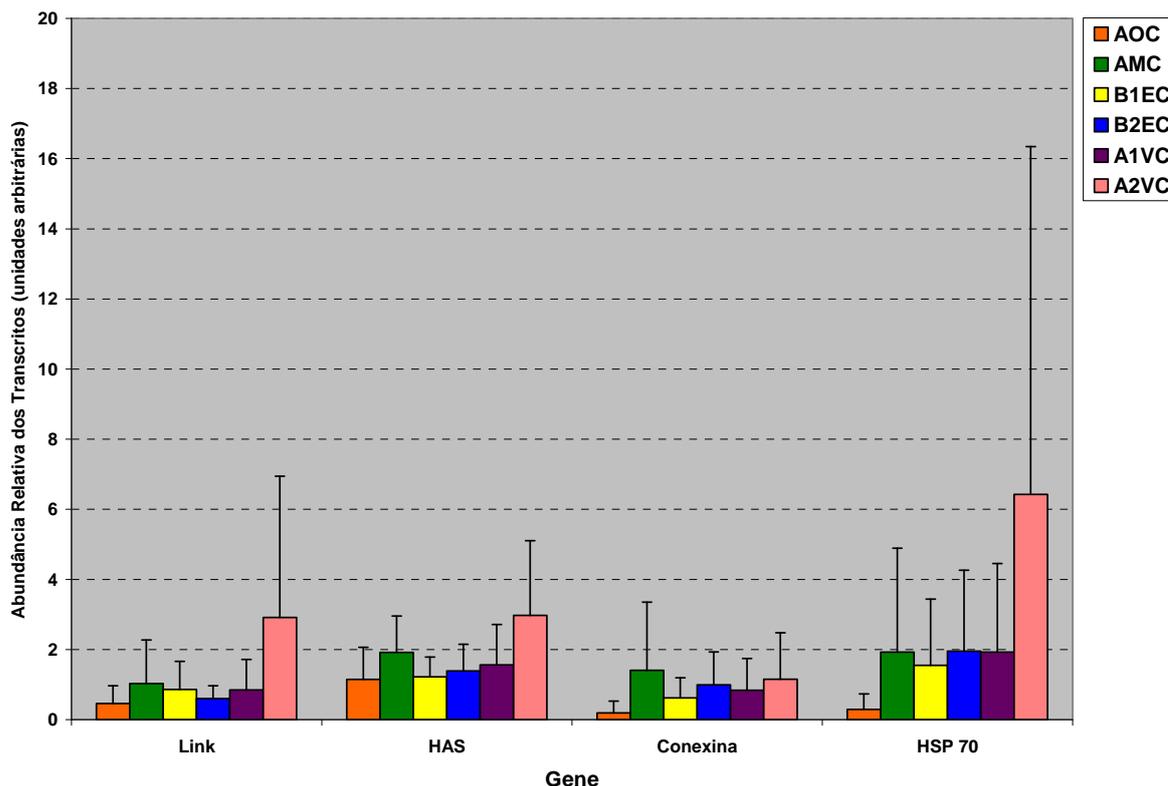


Figura 2: Abundância relativa dos transcritos de *HAPLN1* (*link protein*), *HAS2*, *conexina 43* e *HSP70-1* nos diferentes grupos. AOC (CCOs imaturos); AMC (CCOs submetidos à maturação *in vitro*); B1EC (CCOs maturados após exposição à solução de vitrificação 1); B2EC (CCOs maturados após exposição à solução de vitrificação 2); A1VC (CCOs maturados após a vitrificação na solução 1); A2VC (CCOs maturados após a vitrificação na solução 2).

Para uma visualização mais individualizada dos resultados obtidos nos diferentes grupos, são apresentados, a seguir, gráficos parciais com os valores da média e desvio padrão da abundância relativa dos transcritos de *link protein* (*HAPLN1*), *HAS2*, *conexina 43* e *HSP70-1*, obtidos a partir das células do *cumulus oophorus* de 5 CCOs bovinos em cada um dos seis grupos experimentais, após três repetições.

A Figura 3 mostra a média e desvio padrão da abundância relativa dos transcritos testados no grupo de CCOs imaturos e dos CCOs submetidos à maturação *in vitro* sem tratamento prévio com crioprotetores. Não houve diferença significativa na abundância relativa dos transcritos de *link protein* (*HAPLN1*), *HAS2*, *conexina 43* e *HSP70-1* – respectivamente, $p=0,449$; $p=0,387$; $p=0,186$; e $p=0,315$ –, quando comparados estes dois grupos.

A Figura 4 apresenta a média e desvio padrão da abundância relativa dos transcritos observados nos grupos de CCOs expostos às soluções de vitrificação e

submetidos à maturação *in vitro*.

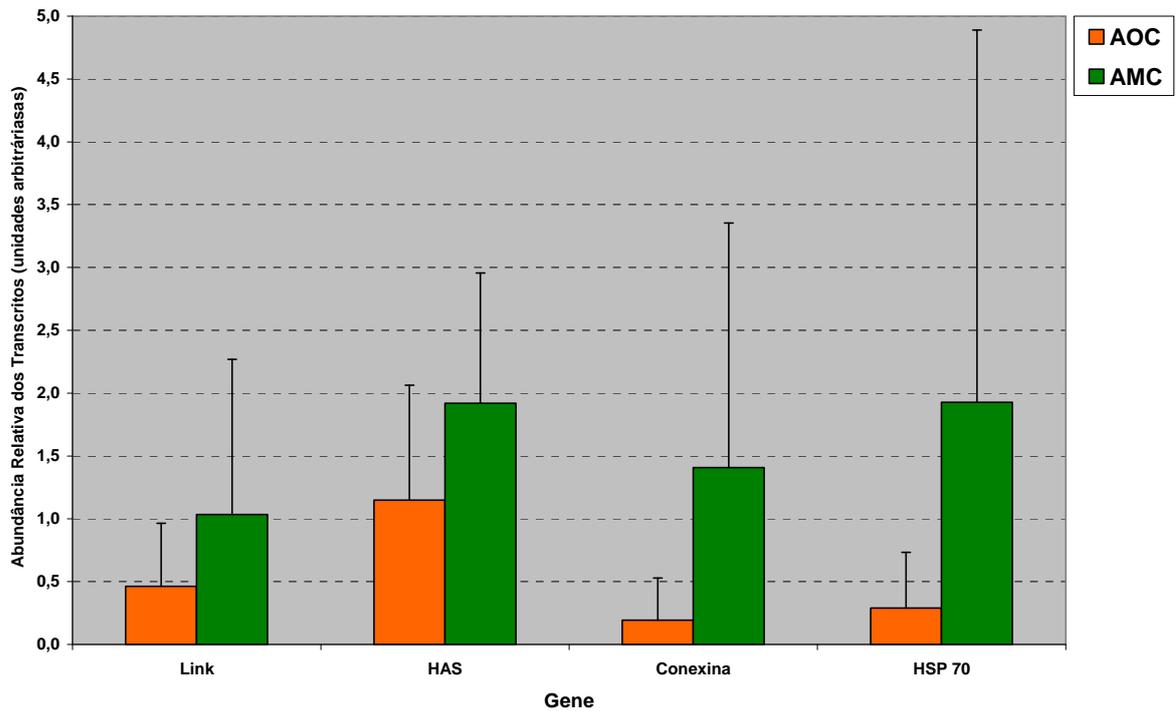


Figura 3: Abundância relativa dos transcritos de *HAPLN1* (*link protein*), *HAS2*, *conexina 43* e *HSP70-1* nos grupos AOC (CCOs imaturos) e AMC (CCOs submetidos à maturação *in vitro*).

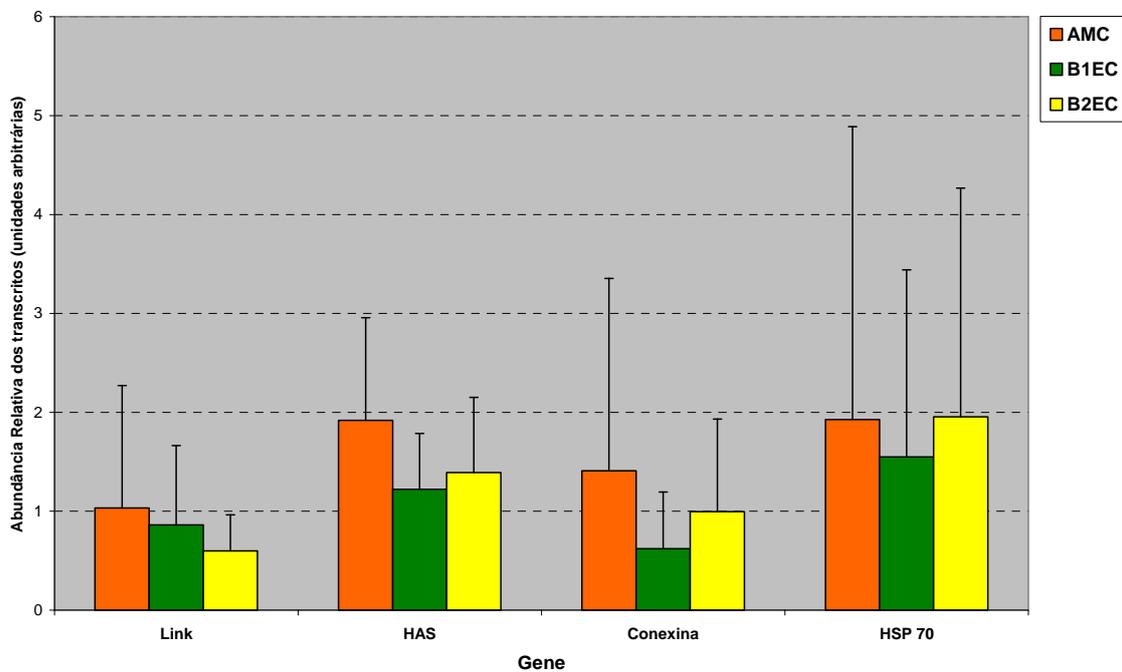


Figura 4: Abundância relativa dos transcritos de *HAPLN1* (*link protein*), *HAS2*, *conexina 43* e *HSP70-1* nos grupos AMC (CCOs submetidos à maturação *in vitro*), B1EC (CCOs maturados após exposição à solução de vitrificação 1) e B2EC (CCOs maturados após exposição à solução de vitrificação 2).

A Figura 5 mostra os valores de abundância relativa dos transcritos quando comparados os grupos de CCOs vitrificados com as soluções de vitrificação SV1 e SV2 e submetidos à maturação *in vitro*.

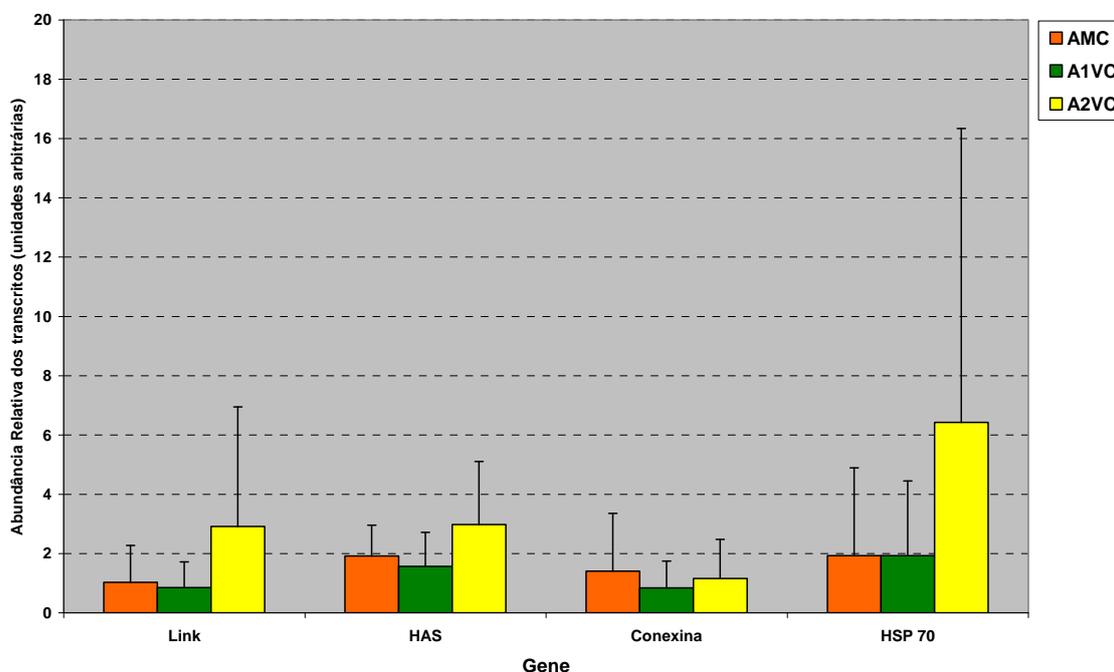


Figura 5: Abundância relativa dos transcritos de *HAPLN1* (*link protein*), *HAS2*, *conexina 43* e *HSP70-1* nos grupos AMC (CCOs submetidos à maturação *in vitro*), A1VC (CCOs maturados após a vitrificação na solução 1) e A2VC (CCOs maturados após a vitrificação na solução 2).

Não foi observada diferença significativa na abundância relativa dos transcritos de *link protein* (*HAPLN1*), *HAS2*, *conexina 43* e *HSP70-1*, quando foram comparados os CCOs frescos maturados *in vitro* com os grupos de CCOs expostos às soluções de vitrificação (respectivamente, $p=0,971$; $p=0,720$; $p=0,863$; e $p=0,865$) ou aqueles vitrificados nestas soluções (respectivamente, $p=0,655$; $p=0,738$; $p=0,926$; e $p=0,713$).

6 DISCUSSÃO

Segundo Wrenzycki *et al.* (2007), uma avaliação precisa da viabilidade embrionária é crucial para o estabelecimento e manutenção da prenhez após transferência embrionária. Entretanto, o sucesso desse processo é obtido, em última etapa, quando se obtém uma prole saudável. Dessa forma, seria importante desenvolver um sistema de avaliação dos embriões durante a produção *in vitro* (PIV), ao longo das etapas de maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV).

O critério utilizado para a avaliação da viabilidade, tanto de embriões quanto de CCOs, é baseado na morfologia das estruturas consideradas de boa qualidade para a PIV. Em relação aos embriões, a utilização da morfologia como critério de seleção está diretamente relacionado com a viabilidade embrionária *in vivo* e *in vitro*. No entanto, esta relação da morfologia com a viabilidade pós MIV, FIV e CIV ainda não está totalmente estabelecida. A utilização de técnicas de biologia molecular para avaliação da qualidade dos CCOs, baseada na análise da expressão de genes relacionados ao processo de maturação *in vitro*, pode ajudar a compreender melhor o que acontece durante a produção *in vitro*, especialmente nesta fase inicial (SAGIRKAYA *et al.*, 2007).

Uma forma prática para a execução dos experimentos com PIV é a coleta de CCOs ou oócitos a partir de ovários de abatedouro e sua preservação a baixas temperaturas através de técnicas de criopreservação (CETIN & BASTAN, 2006). De acordo com Diez *et al.* (2005), apesar dos avanços e da importância da criopreservação de ovários e oócitos, um dos mais difíceis tipos celulares de serem criopreservados ainda é o oócito. Após a criopreservação, na qual a vitrificação aparece como o método com melhores resultados, o oócito apresenta comprometimento da sua capacidade de desenvolvimento. Estudos que avaliam a estrutura dos CCOs criopreservados submetidos a maturação *in vitro* são escassos e não examinam a influência da vitrificação sobre as células da granulosa (MARTINS *et al.*, 2005; CETIN & BASTAN, 2006).

A vitrificação procura evitar a formação de cristais de gelo dentro da célula através do grande aumento da viscosidade da solução utilizada. Porém, tanto a alta concentração dos crioprotetores, que pode tornar-se tóxica para as células quando utilizadas em temperatura inadequada, como o resfriamento, provocam danos

celulares (VAJTA & KUWAYAMA, 2006; CETIN & BASTAN, 2006).

No presente trabalho, foram testadas soluções crioprotetoras de etileno glicol (EG) combinado ao propanediol (PRO) ou ao dimetil sulfóxido (DMSO) + sacarose. Embora a taxa de clivagem obtida após a exposição dos CCOs às soluções crioprotetoras não tenha mostrado diferença significativa entre elas (Tabela 2), ambas mostraram resultados de clivagem inferiores ao grupo controle. Provavelmente, a exposição aos crioprotetores causou danos ao oócito e às células da granulosa, interferindo na taxa de maturação, fecundação e clivagem. Entretanto, os resultados de desenvolvimento até o estágio de blastocisto mostraram que a solução contendo DMSO (SV2) foi mais tóxica aos oócitos que a solução contendo PRO (SV1), que se comportou de forma semelhante ao grupo controle.

Apesar da grande aplicação do DMSO para a vitrificação, Wusteman *et al.* (2002) chegaram a resultados onde a toxicidade desse crioprotetor foi muito mais elevada que soluções contendo butanediol ou propanediol, na vitrificação de células de endotélio vascular. Os autores mencionam o propanediol como um crioprotetor promissor, sob aspectos físicos e biológicos, para experimentos com vitrificação.

Chang *et al.* (2009) também indicam o PRO como um bom crioprotetor para a criopreservação. Em seu trabalho verificaram a ação de 1,5 M de propanediol com 0,5 M de sacarose no congelamento de oócitos imaturos de camundongo. Os autores relatam que o crioprotetor mantém a organização do fuso mitótico de MII a temperaturas abaixo de zero, porém o fuso se desorganiza gradativamente ao longo do processo de reaquecimento pós-congelação com ou sem PRO.

Martins *et al.* (2005) indicam o PRO como um bom crioprotetor, penetrando através da membrana celular mais rápido que o glicerol. Os autores afirmam que uma solução crioprotetora contendo crioprotetores permeáveis (como o etileno glicol) e não permeáveis (como a sacarose) oferece maior vantagem que uma solução com apenas um crioprotetor permeável.

Entretanto, ao avaliar os resultados de vitrificação obtidos no presente trabalho (Tabela 3), percebece-se uma inversão nos resultados obtidos com as duas soluções crioprotetoras. Tanto a taxa de clivagem, quanto à taxa de blastocistos, obtidas com a solução contendo DMSO (43,3% e 4,6%, respectivamente) foram superiores às obtidas com a solução contendo PRO (22,1% e 0,4%, respectivamente). Observa-se que, apesar da solução contendo DMSO ser mais tóxica às células durante a etapa de exposição, esta foi mais eficiente que a solução

contendo PRO na etapa de vitrificação.

Oócitos e embriões sofrem consideráveis danos na sua estrutura e funções durante a criopreservação e provavelmente as células da granulosa também sofrem algum tipo de dano. Entretanto, de alguma forma, parte destas estruturas possui a capacidade de reparar parcial ou completamente os danos, prosseguindo seu desenvolvimento normal (VAJTA & KUWAYAMA, 2006).

O EG é bastante utilizado para vitrificação de oócitos imaturos humanos e bovinos por possuir alta permeabilidade e baixa toxicidade. Já o DMSO tem uma ação tóxica que provoca desarranjo dos microtúbulos no oócito. Cetin & Bastan (2006), ao avaliarem três soluções contendo 40% EG, 40% DMSO ou 20% EG + 20% DMSO + 1M sacarose, como crioprotetores para oócitos bovinos imaturos, chegaram a resultados de maturação (medida pela percentagem de oócitos em metáfase II) de 34,1%, 14,9% e 20,7%, respectivamente, inferiores a taxa obtida no grupo controle (79,6%). As soluções contendo 40% de EG e 40% de DMSO mostraram resultados de maturação significativamente diferentes entre si, porém, a solução combinada de EG + DMSO não diferiu de nenhuma delas. Desta forma, a utilização de DMSO em soluções combinadas de crioprotetores parece ter boa capacidade de vitrificação apesar da maior toxicidade do DMSO isoladamente, corroborando de certa forma os dados apresentados no presente trabalho.

A vitificação de oócitos bovinos imaturos em solução contendo 20% de EG, 9% de Ficol e 0,15M de sacarose, realizada por Abe *et al.* (2005), resultou em $37,7 \pm 10,5\%$ de taxa embriões de 2-células e $8,0 \pm 4,5\%$ de blastocistos, comparadas, respectivamente, as taxas de $66,9 \pm 2,7\%$ e $16,6 \pm 3,2\%$, no grupo controle não criopreservado. Os autores observaram que alguns dos oócitos vitrificados não realizavam a extrusão normal do corpúsculo polar mesmo após a separação dos cromossomos, indicando que tinham a capacidade de maturar normalmente atingindo o estágio de telófase I, mas, apresentavam dano em algum fator regulador chave envolvido na extrusão. Apontam uma provável diferença na atividade metabólica das mitocôndrias dos oócitos vitrificados em relação aos do grupo controle.

Kim *et al.* (2001) relataram alterações no conteúdo de fosfolipídios e composição de ácidos graxos em oócitos bovinos imaturos congelados. Alterações nas mitocôndrias e lipídios após a criopreservação poderiam afetar a fecundação e o processo de desenvolvimento posterior. A distribuição das mitocôndrias está

relacionada com a taxa de metabolismo, proliferação e diferenciação celular, por gerar energia necessária em períodos cruciais do ciclo celular (MATSUMOTO *et al.*, 1998).

Kim *et al.* (2007) obtiveram taxa de 2,3% de blastocistos com a vitrificação de oócitos bovinos imaturos, utilizando uma solução de DMSO e EG como crioprotetores. Os autores sugerem que o dano causado pela criopreservação está associado com a destruição do contato intercelular entre as células do *cumulus* e o oócito, principalmente através das junções comunicantes.

Os eventos que ocorrem durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos influenciam sua capacidade de desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Porém, não há consenso sobre a influência da composição do meio e das condições de maturação sobre o desenvolvimento (HOLM *et al.*, 1999; ALI & SIRARD, 2002) e expressão gênica dos embriões (WATSON *et al.*, 2000; KNIJN *et al.*, 2002). Portanto, a avaliação da capacidade de desenvolvimento (taxa de clivagem e de formação de blastocistos) combinada com medidas qualitativas como a abundância relativa de mRNA pode gerar mais informações sobre as consequências da maturação ou da vitrificação pré-maturação sobre a viabilidade embrionária.

No que se refere à análise da expressão de genes relacionados ao processo de maturação *in vitro*, a literatura dá maior ênfase à expressão de transcritos do oócito, não avaliando, geralmente, a expressão em células da granulosa. As células da granulosa são importantes para o processo de maturação oocitária; além disso, *in vivo*, o desenvolvimento folicular, maturação e ovulação só ocorrem de forma bem sucedida se há uma comunicação entre as células da granulosa e o oócito (TANGHE *et al.*, 2002; VAN SOOM *et al.*, 2002). Buscar um padrão de expressão dos genes no oócito e na células da granulosa associado ao processo de maturação *in vitro* é de grande valia para aperfeiçoar os sistemas de PIV (WRENZYCKI *et al.*, 2007; SAGIRKAYA *et al.*, 2007).

Antes da ativação do genoma embrionário, os mRNAs e proteínas sintetizados durante a maturação contribuem para o desenvolvimento inicial do oócito. Os genes associados a esse período estão envolvidos na regulação do ciclo celular, foliculogênese, estresse celular, sinalização por junções comunicantes, componentes de degradação de matriz extracelular e transporte. As informações sobre expressão gênica das células da granulosa após a vitrificação são escassas na literatura consultada. Não há ainda uma padronização do processo de RT-PCR

para avaliação da abundância de mRNA em diferentes amostras de oócitos e células da granulosa (NEMCOVA *et al.*, 2006; WRENZYCKI *et al.*, 2007). Os trabalhos basicamente discutem a participação das células da granulosa no desenvolvimento do oócito e os processos envolvidos na interação entre as duas estruturas (YOKOO *et al.*, 2002b; IRVING-RODGERS & RODGERS, 2005; TIRELLI *et al.*, 2005; SAGIRKAYA *et al.*, 2007; VIREQUE *et al.*, 2009).

Em nosso experimento a análise da abundância relativa dos diferentes transcritos não mostrou diferença estatística significativa na expressão dos genes entre os diferentes grupos de CCOs (Figura 2). Não se observou diferença quando foi comparada a expressão dos diferentes genes entre CCOs imaturos e após a maturação *in vitro* (Figura 3), ou entre CCOs maturados após a exposição (Figura 4) ou vitrificação (Figura 5) nas diferentes soluções crioprotetoras.

Durante a maturação, ocorre secreção de grandes quantidades de ácido hialurônico (HA) e outras proteínas, que originam uma matriz extracelular gelatinosa envolvida na expansão do complexo *cumulus oophorus*-oócito (SALUSTRI *et al.*, 1999; KIMURA *et al.*, 2002). Quando o HA é adicionado ao meio de maturação e cultivo há um aumento do potencial de desenvolvimento de oócitos (MARQUANT-LE GUIENE *et al.*, 2002) e embriões (FURNUS *et al.*, 1998; STOJKOVIC *et al.*, 1999) bovinos. A expressão da proteína ácido hialurônico sintase 2 (HAS2), envolvida com a síntese de HA pelas células do *cumulus*, tem sido relacionada ao desenvolvimento da competência do oócito (DUNNING *et al.*, 2007). A função da HAS2 no processo de expansão das células do *cumulus* em suínos (YOKOO *et al.*, 2002a) e bovinos (SCHOENFELDER & EINSPANIER, 2003) foi relatada, sendo que a maior intensidade de expressão da proteína foi observada na etapa final do processo de maturação *in vitro*. Irving-Rodgers & Rodgers (2005) também relacionam a importância da HAS com o processo de expansão da matriz. O agregado protéico formado entre o HA e as proteoglicanas, responsável por manter a integridade e dar suporte às funções da matriz extracelular, é dependente da *link protein* (HAPLN1), proteína produzida pelas células do *cumulus* (KOBAYASHI *et al.*, 1999; SUN *et al.*, 1999) e envolvida também na expansão do CCO (SPICER *et al.*, 2003; WRENZYCKI *et al.*, 2007). A importância dos genes *HAS2* e *link protein* durante a maturação sugere uma possível diferença na abundância relativa do mRNA de ambos quando comparados CCOs antes e após a maturação. Entretanto, esta diferença não foi demonstrada, apesar das médias de abundância relativa após a maturação serem

mais altas (Figura 2). Da mesma forma, a expectativa de que a exposição ao crioprotetor e a vitrificação levassem à alteração no perfil de expressão destes genes, por interferir na viabilidade de síntese das células do *cumulus*, não pôde ser observada, pois houve uma variabilidade muito grande no perfil de abundância de mRNA entre as diferentes repetições para os grupos de CCOs (Figuras 4 e 5).

A família de genes *conexina* expressa proteínas que formam junções comunicantes importantes para comunicação célula-célula e resposta coordenada. O mRNA e a proteína do gene *conexina 43* está presente nos CCOs bovinos durante a maturação *in vitro* (WRENZYCKI *et al.*, 1999; CALDER *et al.*, 2003). As junções comunicantes têm uma função importante durante a maturação *in vitro* do oócito bovino, uma vez que o bloqueio da sinalização através das junções comunicantes ou a redução da proteína *conexina 43* resulta em diminuição das taxas de maturação (VOZZI *et al.*, 2001). Além disso, a expansão das células do *cumulus*, evento importante relacionado com a maturação, é acompanhada de modificações nos canais transmembrana formados pela *conexina 43* (DELL'AQUILA *et al.*, 2004). No presente trabalho, não se observou diferença estatística na abundância relativa do mRNA de *conexina 43* entre os grupos de CCOs imaturos e após a maturação *in vitro*, apesar das médias de abundância relativa de todos os grupos de CCOs pós-maturação serem mais altas (Figura 2), principalmente no grupo de CCOs maturados sem tratamento com crioprotetor (Figura 3). O processo de vitrificação expõe as células à substâncias que apresentam algum grau de toxicidade e que, por sua vez, causam certo tipo de lesão ou morte celular. Seria esperado que a exposição dos CCOs aos crioprotetores ou a vitrificação causassem alguma interferência na viabilidade das células do *cumulus* e no arranjo protéico intercelular, afetando a expressão da *conexina 43*. Este efeito não foi observado quando comparada a abundância de mRNA de *conexina 43* entre os grupos de CCOs maturados (Figuras 4 e 5). Provavelmente, exista uma grande variação entre os CCOs selecionados para os experimentos e na resposta destes aos diferentes tratamentos, pois os resultados mostram uma variabilidade muito grande no perfil de abundância de mRNA entre as diferentes repetições para os grupos de CCOs (Figuras 2 a 5). Tsai *et al.* (2003) relatam grande variação nos níveis de mRNA de *conexina 43* nas células da granulosa de folículos humanos e supõem que esta resposta variável ocorra, provavelmente, em função da grande quantidade de células da granulosa utilizadas no experimento.

A influência da composição do meio sobre a maturação é outro ponto a ser levado em consideração. O soro tem efeito supressor na expressão do mRNA de *conexina 43* em blastocistos bovinos (WRENZYCKI *et al.*, 1999). Calder *et al.* (2005) relatam que a abundância de mRNA de *conexina 43* em CCOs bovinos maturados *in vitro* foi maior com o meio suplementado com concentrações mais altas de soro, no qual foi observado aumento da expansão das células do *cumulus*; os autores sugerem que se ocorre redução de mRNA de *conexina 43* durante a maturação, isto é afetado mais pelo soro do que pela expansão do *cumulus*.

Os genes *HSP* têm vários papéis nas funções celulares, incluindo modulação de atividade protéica, regulação da degradação de proteínas e transporte através de organelas, além de garantirem o correto dobramento das proteínas (TAKAYAMA *et al.*, 2003). As HSPs estão envolvidas na regulação da apoptose celular e a HSP70 previne tanto a morte celular dependente como a independente de caspase (RAVAGNAN *et al.*, 2001). Park *et al.* (2006) mostraram um aumento da abundância dos transcritos de *HSP70* em embriões bovinos vitrificados, comparados com embriões não criopreservados; para os autores este aumento é indicativo de uma resposta ao estresse e da diminuição da qualidade dos embriões, em função dos danos causados pela vitrificação. O acúmulo de transcritos durante o período de crescimento do oócito é fundamental para o desenvolvimento inicial até a ativação do genoma embrionário. Entretanto, durante a MIV, os oócitos e as células da granulosa são expostos uma série de suplementos, como soro ou BSA, que podem afetar a transcrição dos genes. Sagirkaya *et al.* (2007) e Vireque *et al.* (2009) sugerem que o aumento da abundância relativa de *HSP70* em blastocistos bovinos produzidos *in vitro* está associado com a suplementação do meio com BSA ou soro durante a maturação dos oócitos. Ao contrário, trabalhos anteriores (LAZZARI *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006) mostram que a suplementação protéica com BSA ou soro no meio de maturação ou cultivo não alteram o perfil de abundância do mRNA de *HSP70* dos embriões. No presente trabalho, a resposta ao estresse da exposição dos CCOs imaturos aos crioprotetores e ao processo de vitrificação não causou diferença significativa na abundância relativa dos transcritos de *HSP70* (Figuras 4 e 5).

Possivelmente, a abundância relativa do mRNA de *HSP70* esteja relacionada com a quantidade das células do *cumulus* presentes nas amostras e no efeito que a criopreservação tem sobre a viabilidade destas células; talvez mesmo

com a perda de muitas células durante o processo de criopreservação, as células restantes aumentariam o padrão de expressão de *HSP70* na tentativa de evitar a morte celular. Entretanto, mesmo entre os CCOs não vitrificados não houve significância estatística, apesar da média na abundância relativa dos transcritos de *HSP70* após a maturação ser mais alta do que nos CCOs imaturos (Figura 3). Como já mencionado anteriormente, é provável que exista uma grande variação entre os CCOs selecionados para os experimentos e na resposta destes aos diferentes tratamentos, levando à grande variabilidade observada no perfil de abundância de mRNA entre as diferentes repetições para os grupos de CCOs.

As mesmas condições de maturação e cultivo *in vitro* foram utilizadas para todos os grupos de CCOs para observar o possível efeito da vitrificação na abundância dos transcritos após a maturação e sobre o desenvolvimento embrionário. Diferentes genes expostos às mesmas condições experimentais podem ser induzidos diferencialmente dependendo de qual processo físico é afetado. Entretanto, foram observadas grandes variações no perfil de abundância de mRNA entre as diferentes repetições para os grupos de CCOs expostos ao mesmo tratamento. Isto sugere que a falta de significância estatística para a abundância relativa de mRNA entre os tratamentos pode ser devida a grande variação entre as amostras de CCOs, como é relatado em trabalhos com embriões bovinos (BILODEAU-GOESEELS & PANICH, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Outra possibilidade para esta variação no perfil de abundância relativa entre os grupos pode estar relacionada como sistema de MIV utilizado para os experimentos; a suplementação do meio com soro tem sido relacionada à variabilidade de resposta de embriões (KNIJN *et al.*, 2002) e de CCOs bovinos *in vitro* (CALDER *et al.*, 2005).

Apesar dos resultados obtidos não mostrarem soluções diretas para melhorar as condições de maturação *in vitro* ou formas de avaliar, através da técnica de PCR, o impacto que o processo causa às células do *cumulus*, pode-se inferir que, nas condições de maturação utilizadas, os genes escolhidos talvez não sejam bons marcadores de avaliação para esta fase da PIV. Há necessidade de avaliar outros genes como marcadores, buscando elucidar melhor o efeito que a vitrificação causa sobre as células do *cumulus*. Embora tenha sido observada uma grande variabilidade de resposta dos CCOs na expressão dos transcritos, a expressão nos oócitos e nos embriões produzidos a partir destes não foi avaliada, e talvez pudesse trazer esclarecimentos e novos questionamentos em relação ao processo de

maturação.

7 CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados observados, pode-se concluir que:

- a exposição dos complexos *cumulus oophorus*-oócito (CCOs) bovinos às soluções crioprotetoras e a vitrificação diminuíram a viabilidade dos oócitos e sua capacidade de desenvolvimento embrionário *in vitro*;

- apesar da maior toxicidade, o DMSO foi mais eficiente que o PRO no processo de vitrificação dos CCOs bovinos, permitindo maior desenvolvimento *in vitro* até o estágio de blastocisto;

- as condições de maturação *in vitro*, a exposição às soluções crioprotetoras e a vitrificação não afetaram a expressão dos transcritos nas células do *cumulus oophorus* bovinos;

- os genes utilizados não se mostraram bons marcadores para a avaliação do processo maturação e vitrificação de CCOs no que se refere ao comportamento das células do *cumulus oophorus* bovinos, nas condições em que foram realizados os experimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, Y.; HARA, K.; MATSUMOTO, H.; KOBAYASHI, J.; SASADA, H.; EKWALL, H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; SATO, E. Feasibility of a nylon-mesh holder for vitrification of bovine germinal vesicle oocytes in subsequent production of viable blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 6, p. 1416-1420, 2005.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Células germinativas e fecundação. In: _____. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 20, p. 1127-1156.
- ALI, A.; SIRARD, M.-A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, v. 66, p.901-905, 2002.
- BÉZARD, J. Aspects of in vivo and in vitro fertilization of the equine oocyte. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, v. 25, n. 1, p. 36-61, 1997. (Supl.).
- BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early embryos. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.143-155, 2002.
- BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A. C.; EPPIG, J. J. Interactions between somatic cells and germ cells during mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 543-547, 1990.
- CALDER, M. D.; CAVENEY, A.N.; SMITH, L.C.; WATSON, A.J. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 14, 2003.
- CALDER, M. D.; CAVENEY, A.N.; SIRARD, M.-A.; WATSON, A.J. Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte-complexes during maturation in vitro. **Fertility and Sterility**, v. 83, supl. 1, p. 1077-1085, 2005.
- CAMAIONI, A.; SALUSTRI, A.; YANAGISHITA, M.; HASCALL, V.C. Proteoglycans and proteins in the extracellular matrix of mouse cumulus cell-oocyte complexes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 335, n. 2, p. 190-198, 1996.
- CETIN, Y.; BASTAN, A. Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification in straws. **Animal Reproduction Science**, v. 92, p. 29-36, 2006.
- CHANG, A.S.; DALE, A.N.; MOLEY, K.H. Maternal diabetes adversely affects preovulatory oocyte maturation, development and granulosa cell apoptosis. **Endocrinology**, v. 146, p. 2445-2453, 2005.
- CHANG, C. C.; SUNG L.Y.; LIN, C.J., KORT H.I.; YANG X.; TIAN C., NAGY, Z.P. The oocyte spindle is preserved by 1,2-propanediol during slow freezing. **Fertility and Sterility**. 2009. (article in press).

- CHECURA C.M.; SEIDEL Jr., G.E. Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes. **Theriogenology** v. 67, p. 919-930, 2007.
- 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, p. 87-93, 1993.
- DELL'AQUILA, M.E.; CAILLAUD, M.; MARITATO F.; MARTORIATI A.; GERARD, N.; AIUDI, G.; MINOIA, P.; GOUDET G. Cumulus expansion, nuclear maturation and connexin 43, cyclooxygenase-2 and FSH receptor mRNA expression in equine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro in the presence of FSH and precursors for hyaluronic acid synthesis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2 p. 44, 2004.
- DIELEMAN, S.J.; HENDRIKSEN, P.J.; VIUFF, D.; THOMSEN, P.D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H.M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T.A.; NIEMANN, H.; GADELLA, B.M.; BEVERS, M.M.; VOS, P.L. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v. 57, p. 5-20, 2002.
- DIEZ, C.; DUQUE,P.; GÓMEZ, E.; HIDALGO, C.O.; TAMARGO, C.; RODRIGUEZ, A.; FERNÁNDEZ, L.; DE LA VARGA, S.; FERNÁNDEZ, A.; FACAL, N.; CARBAJO, M. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. **Theriogenology**, v. 64, p. 317–333, 2005.
- DRIANCOURT, M. A. *et al.* Ovarian Function. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C.; HUNTER, R. H. F. (Eds.). **Reproduction in mammals and man**. Paris: Ellipses, 1993. cap. 15, p. 281-305.
- DUNNING, K.R.; LANE, M.; BROWN H.M., YEO, C.; ROBKER, R. L.; RUSSELL, D. L. Altered composition of the cumulus-oocyte complex matrix during in vitro maturation of oocytes. **Human Reproduction**, v. 22, n. 11, p. 2842–2850, 2007.
- EDWARDS, J.L.; KING, W.A.; KAWARSKY, S.J.; EALY, A.D. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of hsp70 and glutathione. **Theriogenology**, v. 55, p. 209-223, 2001.
- EPPIG, J.J.; O'BRIEN, M.; WIGGLESWORTH, K. Mammalian oocyte growth and development in vitro. **Molecular and Reproduction Development**, v. 44, p. 260-273, 1996.
- FERREIRA, E.M; VIREQUE, A.A.; ADONA , P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v.71, n.5, p.836-848, 2009.
- FURNUS, C.C.; DE MATOS, D.G.; MARTINEZ, A.G. Effect of hyaluronic acid on development of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.49, p. 1489-1499, 1998.

- GERSHON, E.; PLAKS, V.; DEKEL, N. Gap junctions in the ovary: Expression, localization and function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 282, p. 18-25, 2008.
- 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.
- HAFEZ, E.S.E. Folliculogenesis, egg maturation and ovulation. In: _____. **Reproduction in farm animals**. 6. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 114-143.
- HENDRIKSEN, P.J.; VOS, P.L.; STEENWEG, W.N.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 11-20, 2000.
- HOLM, P.; BOOTH, P. J.; SCHMIDT, M. H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. **Theriogenology**, v.52, p. 683-700, 1999.
- HUBÁLEK, Z. Protectants used in the Cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v.46, p.205-29, 2003.
- IRVING-RODGERS, H.F.; RODGERS, R.J. Extracellular matrix in ovarian follicular development and disease. **Cell Tissue Research**, v. 322, p. 89-98, 2005.
- ISHIMORI, H.; TAKAHASHI, .Y; KANAGAWA, H. Factors affecting survival of mouse blastocysts vitrified by a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. **Theriogenology**, v. 38, n. 6, p. 1175-1185, 1992.
- JOHNSON, M.L.; REDMER, D.A.; REYNOLDS, L.P.; GRAZUL-BILSKA, A.T. Expression of gap junctional proteins connexin 43, 32, and 26 throughout follicular development and atresia in cows. **Endocrine**, v.10, p. 43-51, 1999.
- JUNEJA, S.C.; BARR, K.J.; ENDERS, G.C.; KIDDER, G.M. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. **Biology of Reproduction**, v. 60, p.1263-1270, 1999.
- KAWARSKY, S.J.; KING, W.A. Expression and localisation of heat shock protein 70 in cultured bovine oocytes and embryos. **Zygote** v.9, p 39-50, 2001.
- KIM, J.Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. **Reproduction**, v.122, p.131-138, 2001.
- KIM, D.H.; PARK, H.S.; KIM, S.W.; HWANG, I.S.; YANG, B.C.; IM, G.S.; CHUNG, H.J.; SEONG, H.W.; MOON, S.J.; YANG, B.S. Vitrification of immature bovine oocytes by the microdrop method. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, p.843-851, 2007.
- KIMURA, N.; KONNO, Y.; MIYOSHI, K.; MATSUMOTO, H.; SATO, E. Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine *cumulus*-oocyte

- complexes during *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 707-717, 2002.
- KNIJN, H.M.; WRENZYCKI, C.; HENDRIKSEN, P.J.; VOS, P.L.; HERRMANN, D.; VAN DER WEIJDEN, C.G.; NIEMANN, H.; DIELEMAN, S.J. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived *in vitro* or *in vivo*. **Reproduction**, v.124, p.365-375, 2002.
- KOBAYASHI, H.; SUN, G.W.; HIRASHIMA, Y.; TERAOKA, T. Identification of link protein during follicle development and cumulus cells cultures in rats. **Endocrinology**, v. 140, n.8, p. 3835-3842, 1999.
- KONISHI, M.; AOYAGI, Y.; TAKEDOMI, T.; ITAKURA, H.; ITOH, T.; YAZAWA, S. Presence of granulosa cells improved *in vitro* development of IVM-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. **Theriogenology**, v. 45, n.3, p. 573-581, 1996.
- KUBOTA, C., YANG, X., DINNYES, A., TODOROKI, J., YAMAKUCHI, H., MIZOSHITA, K., INOHAC, S. And TABARA, N. *In vitro* survival frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, n.3, p.281-286, 1998.
- LAZZARI, G.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; DUCHI, R.; KRUIP, T.; NIEMANN, H., GALLI, C. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. **Biology of Reproduction**, v.67, p.767-775, 2002.
- LEHMKUHL, R. C.; MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A. D.; BARBIERI, D. P.; MACHADO, M. F.; RUBIN, M. I. B.; SILVA, C. A. M. Viabilidade de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular. **Ars. Veterinaria**, Jaboticabal, v.18, n.3, p.273-279, 2002.
- LI, R.; NORMAN, R.J.; ARMSTRONG, D.T.; GILCHRIST, R.B. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, n.3, p. 839-845, 2000.
- LIEBERMANN, J.; NAWROTH, F.; ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; RAHIMI, G.; TUCKER, M.J. Potential Importance of Vitrification in Reproductive Medicine. **Biology of Reproduction**, v. 67, p.1671-1680, 2002.
- MARQUANT-LE GUIENE, B.; GUYADER-JOLY, C.; PONCHON, S.; DELALLEAU, N.; HUMBLLOT, P. Effect of hyaluronic acid in a serum free maturation medium on bovine embryo development. **Theriogenology**, v.51, p. 386, 2002.
- MARTINS, R.D.; COSTA, E.P.; CHAGAS J.S.C.; IGNACIO, F.S.; TORRRES, C.A.A.; MCMANUS, C. Effects of vitrification of immature bovine oocytes on *in vitro* maturation. **Animal Reproduction**, v.2, n.2, p.128-134, 2005.
- MASTROMONACO, G.F.; SEMPLE, E.; ROBERT, C.; RHO, G.J.; BETTS, DH; KING, W.A. Different culture media requirements of IVF and nuclear transfer bovine embryos. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 39, p. 462-467, 2004.

- MATSUMOTO, H.; SHOJI, N.; SUGAWARA, S.; UMEZU, M.; SATO, E. Microscopic analysis of enzyme activity, mitochondrial distribution and hydrogen peroxide in two-cell rat embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.113, p.231-238, 1998.
- MATZUK, M.M.; BURNS, K.H.; VIVEIROS, M.M.; EPPIG, J.J. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science**, v. 296, p. 2178-2180, 2002.
- MEZZALIRA, A., MEZZALIRA, J.C., BARBIERI, D.P., LOHN, L., SANTOS, R.M., VIEIRA, A.D., DAMIANI, J.C. Vitriificação de embriões bovinos produzidos in vitro: Avaliação de dois protocolos. **Acta. Scientiae Veterinariae**, v.31, p-480-481, 2003 (Abstract).
- NEMCOVA, L.; MACHATKOVA, M.; HANZALOVA, K.; HORAKOVA, J.; KANKA, J. Gene expression in bovine embryos derived from oocytes with different developmental competence collected at the defined follicular developmental stage. **Theriogenology**, v. 65, p. 1254-1264, 2006.
- OLIVEIRA, A.T.D.; LOPES, R.F.F., RODRIGUES, J.L.. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro with different serum concentrations. **Reproduction in Domestic Animals**, v.414, p. 129-136, 2006.
- OTOI, T., YAMAMOTO, K., KOYAMA, N., SUZUKI, T. *In vitro* fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. **Cryobiology**, v.32, n.5, p. 455-60, 1995.
- PARK, S.Y.; KIM, E.Y.; CUI, X.S.; TAE, J.C.; LEE, W.D.; KIM, N.H.; PARK, S.P.; LIM, J.H. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. **Zygote**, v.14, p.125-131, 2006.
- PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; FIRST, N.L. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. **Theriogenology**, v.24, p.537-548, 1985.
- PRIEDKALNS, J.; LEISER, R. Female reproductive system. In: DELLMANN, H. D.; EURELL, J. **Textbook of veterinary histology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998. cap. 13, p. 247-253.
- RABIN, Y.; STEIF, P.S.; HESS, K. C.; JIMENEZ-RIOS, J.L.; PALASTRO, M.C. Fracture formation in vitrified thin films of cryoprotectants. **Cryobiology**, v. 53 , p. 75-95, 2006.
- RALL, W.F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v.24, p. 387-402, 1987.
- RAVAGNAN, L.; GURBUXANI, S.; SUSIN, S.A.; MAISSE, C.; DAUGAS, E.; ZAMZAMI, N.; MAK, T.; JAATTELA, M.; PENNINGER, J.M.; GARRIDO, C.; KROEMER, G. Heat-shock protein 70 antagonizes of apoptosis-inducing factor. **Nature Cell Biology**, v.3, p.839-843, 2001.

- RICHARDS, J.S.; LIU, Z.; SHIMADA, M. Immune-like mechanisms in ovulation. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.19, n. 6, p.11-196, 2008.
- SAGIRKAYA, H.; MISIRLIOGLU, M.; KAYA, A.; FIRST, N.L.; PARRISH, J.J.; MEMILI, E. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. **Animal Reproduction Science**, v.101, p. 225-240, 2007.
- SALUSTRI, A.; CAMAIONI, A.; DI GIACOMO, M.; FULOP, C.; HASCALL, V.C. Hyaluronan and proteoglycan in ovarian follicles. **Human Reproduction Update**, v.5, n. 4, p.293-301, 1999.
- SALUSTRI, A.; ULISSE, S.; YANAGISHITA, M.; HASCALL, V.C. Hyaluronic acid synthesis by mural granulosa cells and cumulus cells in vitro is selectively stimulated by a factor produced by oocytes and by transforming growth factor- β . **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 32, p. 19517-19523, 1990.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v. 3.
- SCHOENFELDER, M.; EINSPANIER, R. Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 269-277, 2003.
- SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1241-1254, 2001.
- SIRARD, M. A.; BILODEAU, S. Effects of granulosa cell co-culture on in-vitro meiotic resumption of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 89, p. 459-465, 1990.
- SIRARD, M.A.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**, v. 68, p. S71-S76, 2007. (Supl.).
- SPICER, A.P.; JOO, A.; BOWLING Jr., R.A. A hyaluronan binding link protein gene family whose members are physically linked adjacent to chondroitin sulfate proteoglycan core protein genes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 23, p. 21083-21091, 2003.
- STOJKOVIC, M.; THOMPSON J.G.; TERVIT, H.R. Effects of hyaluronic acid supplementation on in vitro development of bovine embryos in a two-step culture system. **Theriogenology**, v.51, p. 254, 1999.
- SUN, G. W.; KOBAYASHI, H.; TERAQ, T. Expression of link protein during mouse follicular development. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 47, n. 11, p. 1433-1442, 1999.
- SUZUKI, T., BOEDIONO, A., TAKAGI, M., SAHA, S.; SUMANTRI, C. Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle bovine oocytes by a one-step dilution method *in vitro*. **Cryobiology**, v.33, p.515-524, 1996.

- SZÖLÖSI, D. Oocyte maturation. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C.; HUNTER, R. H. F. (Eds.). **Reproduction in mammals and man**. Paris: Ellipses, 1993. cap. 16, p. 307-325.
- TAKAYAMA, S.; REED, J.C.; HOMMA, S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. **Oncogene**, v.22, p.9041-9047, 2003.
- TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M.; DE KRUIF, A. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n.3, p. 414-424, 2002.
- TESTART, J. Criteria for evaluating the quality of oocytes and their aptitude for IVF. **Annales de Biologie Clinique**, v. 43, n.1, p. 17-21, 1985.
- TIRELLI, M.; BASINI, G.; GRASSELLI, F.; BIANCO, F.; TAMANINI, F.. Cryopreservation of pig granulosa cells: effect of FSH addition to freezing medium. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 28, p.17-33, 2005.
- TIRONE, E.; D'ALESSANDRIS, C.; HASCALL, V.C.; SIRACUSA, G.; SALUSTRI, A. Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle-stimulating hormone (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor β_1). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 4787-4794, 1997.
- TSAI, M.Y.; LAN, K.C.; HUANG, K.E.; HUANG, F.J.; KUNG, F.T.; CHANG, S.Y. Significance of mRNA levels of connexin37, connexin43, and connexin45 in luteinized granulosa cells of controlled hyperstimulated follicles. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 6, p.1437-1443, 2003.
- VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 61, p. 357-364, 2000.
- VAJTA, G., HOLM, P., GREVE, T., KALLESEN, H. The submarine incubation system, a new tool for in vitro embryo culture: a technique report. **Theriogenology**, v.48, p.1379-1385, 1997.
- VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P. J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open pulled straws (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p.53-58,1998.
- VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v.65, p.236-244, 2006.
- VAN SOOM, A.; TANGHE, S.; DE PAUW, I.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Function of cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 37, n.3, p. 144-151, 2002.
- VIEIRA, A.D.; MEZZALIRA, A.; BARBIERI, D.P.; LEHMKUHL, R.C.; RUBIN, M.I.B.; VAJTA, G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. **Cryobiology**, v.45, p.91-94, 2002.

- VIREQUE, A.A.; CAMARGO, L.S.A.; SERAPIA, R.V.; ROSA E SILVA, A.A.M.; WATANABE, Y.F.; FERREIRA, E.M., NAVARRO, P.A.A.S.; MARTINS, W.P.; FERRIANI, R.A. Preimplantation development and expression of Hsp-70 and Bax genes in bovine blastocysts derived from oocytes matured in alpha-MEM supplemented with growth factors and synthetic macromolecules. **Theriogenology**, v.71, p.620-627, 2009.
- VOZZI, C.; FORMENTON, A.; CHANSON, A.; SENN, A.; SAHLI, R.; SHAW, P.; NICOD, P.; GERMOND, M.; HAEFLIGER, J.A. Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytes. **Reproduction**, v.122, p.619-628, 2001.
- WATSON, A.J.; SOUSA, P.D.; CAVENEY, A.; BANCROFT, L.C.; NATALE, D.; URQUHART, J.; WESTHUSIN, M.E. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcripts levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biology of Reproduction**, v.62, p.355-364, 2000.
- WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in pre-implantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. **Molecular Reproduction and Development**, v.53, p.8-18, 1999.
- WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**, v.68S, p.S77-S83, 2007.
- WUSTEMAN, M.C.; PEGG, D.E.; ROBINSON; M.P.; WANG, L-H; FITCH, P. Vitrification media: toxicity, permeability, and dielectric properties. **Cryobiology**, v.44, p.24-37, 2002.
- YAMADA, C.; CAETANO, H.V.A.; SIMOES, R.; NICACIO, A.C.; FEITOSA, W.B.; D'AVILA, M.E.O.; ASSUMPÇÃO, J.A.V. Comparison of different associations with ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 384-388, 2007.
- YANG, X. Cellular and molecular regulation of oocyte maturation, activation and fertilization in cattle. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, Porto Alegre, v. 25, n. 1, p. 84-92, 1997. (Supl.).
- YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P.E.; PRESICCE, G.A. Control of oocyte maturation in cows - biological factors. **Theriogenology**, v. 49, n.2, p. 471-482, 1998a.
- YANG, B.C., RYU, L.S., KIM, I.H., YEON, S.H., CHOI, S.S., SON, D.S., IM, K.S. and HWANG, W.S. Effect of freezing of immature and mature bovine oocytes on their development to blastocyst *in vitro*. 8th World Conference on Animal Production June 28-July 4. Seoul. Korea. **Proceedings...** Contributed Papers vol. II. p. 950-951.1998b.
- YOKOO, M.; MIYAHAYASHI, Y.; NAGANUMA, T.; KIMURA, N.; SASADA, H.; SATO, E. Identification of hyaluronic acid-binding proteins and their expression in porcine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1165-1171, 2002a.

YOKOO, M.; TIENTHAI, P.; KIMURA, N.; NIWA, K.; SATO, E.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Localization of the hyaluronan receptor CD44 in porcine cumulus cells during in vivo and in vitro maturation. **Zygote**, v.10 , p. 317-326, 2002b.

ZHUO, L.; KIMATA, K. Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. **Cell Structure and Function**, v. 26, p. 189-196, 2001.