UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

Mayra Scanzani

"Expansão do *cumulus oophorus* de oócitos bovinos maturados *in vitro* na presença de fosfatidilcolina ou ácido linoleico conjugado"

RIBEIRÃO PRETO – SP

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

Mayra Scanzani

"Expansão do *cumulus oophorus* de oócitos bovinos maturados *in vitro* na presença de fosfatidilcolina ou ácido linoleico conjugado"

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: ***Alessandra Aparecida Vireque***

RIBEIRÃO PRETO – SP

2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Magda e Antônio, por estarem sempre ao meu lado em todas as ocasiões, o amor incondicional que recebo de vocês a vida inteira e por me apoiarem nas minhas escolhas, acreditando e confiando em mim.

Agradeço à minha família, minha tia Lei, minha avó Diô e minha priminha Lú por mesmo de longe sempre me darem apoio e suporte em todos os momentos, sempre preocupadas como as coisas estavam andando e acreditando no meu trabalho.

Agradeço muito à minha orientadora Alessandra Aparecida Vireque que possibilitou que eu pudesse dar os primeiros passos em minha carreira profissional.

Agradeço aos meus amigos, Barbie, Duda, Johnny, Lara, Preta e Varvs por me acompanharem por toda essa trajetória desde o começo e juntos passamos por inúmeras situações, sempre nos apoiando um no outro.

Agradeço também aos amigos que fui conhecendo ao longo do caminho, Abs, Cuti, Loba, Sis e Trite por estarem do meu lado sempre que precisei e garantir altas risadas. Agradeço ao Thiago por me ajudar tanto na confecção deste trabalho, sempre paciente, atencioso e prestativo.

Agradeço à turma 46, com todas as pessoas maravilhosas que formam essa família na qual vivi 4 anos de companheirismo, tensões, risadas e sempre mantendo a união.

Agradeço às meninas do Laboratório de GO, onde realizamos as atividades, por me ajudarem nos procedimentos e me ensinarem como é rotina de um laboratório. Agradeço em especial à Lú, por estar sempre disposta a me ajudar e realizar os experimentos comigo, à Cris, por me ensinar e me ajudar nas etapas seguintes, e ao Eduardo, por me acompanhar no nosso processo de aprendizagem.

A Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e ao Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto por todo suporte e ao Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia onde tudo foi realizado.

Aos professores da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela minha excelente formação.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento do projeto.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 10

1.1 Maturação *in vitro* 12

1.2 Ácidos graxos e fosfolipídios 14

1.3 Importância dos lipídios na maturação oocitária e desenvolvimento *in vitro* 17

1.4 Expansão do *cumulus oophorus* 19

1.5 Genes reguladores da expansão do cumulus oophorus 23

1.5.1 Ciclooxigenase 2 (COX-2) 23

1.5.2 Pentraxina 3 (PTX3) 24

1.5.3 Fator de crescimento diferenciação 9 (GDF-9) 24

2. OBJETIVO 25

3. MATERIAIS E MÉTODOS 25

3.1 Padronização de técnicas e experimento piloto 25

3.2 Delineamento Experimental 26

3.3 Procedimentos para a maturação *in vitro* 27

3.3.1 Obtenção dos ovários 27

3.3.2 Aspiração, manipulação e seleção de oócitos 28

3.3.3 Meio de cultivo padrão para maturação in vitro 29

3.4 Mensuração do diâmetro de cumulus 29

3.5 Procedimentos Pós-MIV 31

3.6 Análise estatística 32

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 32

4.1 Experimento piloto 32

4.2 Determinação dos efeitos do LA e PC no grau de expansão do *cumulus ophorus* de oócitos bovinos 34

5. REFERÊNCIAS 40

LISTA DE ABREVIATURAS

CC	Células do cumulus
MIV	Maturação *in vitro*
TRA	Tecnologia da reprodução assistida
SOP	Síndrome dos ovários policísticos
FIV	Fertilização *in vitro*
AG	Ácidos graxos
PL	Fosfolipídios
CCO	Complexo cumulus-oócito
TCM-199	Tissue Culture Medium
LA	Ácido linoleico
PL	Fosfolipídios
AA	Ácido araquidônico
IP3	Inositol-3-fosfato
DAG	Diacilglicerol
DHA	Docosahexaenoico
GDF-9	Fator de crescimento e diferenciação-9
BMP-15	Proteína óssea morfogenética-15
COX2	Ciclooxigenase 2
PTGS2	Prostaglandina sintetase 2
PTX3	Pentraxina 3
TSG6	Fator de necrose tumoral 6
HAS2	Hialuronato sintase 2
PG	Prostaglandinas
COX1	Ciclooxigenase 1
PGE2	Prostaglandina E2

Resumo

Estudos de lipidômica de oócitos e embriões destacaram recentemente a importância dos lipídios como moléculas sinalizadoras e constituintes das membranas biológicas e seu potencial impacto nas biotécnicas aplicadas à reprodução. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência de duas classes de lipídios, um fosfolipídio e um ácido graxo, na maturação *in vitro* do complexo cumulus-oócito, mais especificamente no processo de expansão do *cumulus oophorus*, visando à transferência de tecnologia para a Reprodução Assistida Humana. Foram usados oócitos bovinos como modelo experimental. Os complexos cumulus-oócito (CCOs) foram aspirados de folículos medindo de 3 a 8 mm de ovários obtidos em abatedouro e maturados em meio TCM-199 suplementado com 10% de soro, 5 µg/mL FSH, 0.5 µg/mL LH, com ou sem a adição de ácido linoleico (LA) ou fosfatidilcolina (PC), durante 22h a 38,5 °C em atmosfera úmida de 5% de CO2. Os CCOs foram cultivados na densidade de 1 CCO/10 µL de meio e avaliados quanto ao grau de expansão do *cumulus oophorus* imediatamente antes e após a MIV. Cada CCO foi microfotografado e o maior e menor diâmetro do *cumulus oophorus* foi medido com auxílio de uma régua micrométrica calibrada usando zoom 5x e o software AxioVision (Zeiss). O aumento do diâmetro do cumulus foi analisado pelo modelo de regressão linear de efeitos mistos através do software SAS 9.0, utilizando a PROC MIXED. O nível de significância adotado foi de 5%. O presente estudo mostrou que não houve redução no diâmetro de *cumulus oophorus* de oócitos maturados *in vitro* em meio suplementado com LA a 200 µM ou PC a 100 µM, em comparação com os diâmetros pós-MIV dos CCOs controles. Avaliações subsequentes serão instituídas para ampliar o número amostral e correlacionar estes achados com a expressão de genes reguladores da maturação terminal do CCO e expansão do *cumulus oophorus*.

Abstract

Embryo and oocyte lipidomic studies recently highlighted the importance of lipids as signaling molecules and constituents of biological membranes as well as their potential impact on reproductive applied biotechnologies. The aim of this study was to evaluate the influence of two types of lipids, a phospholipid and a fatty acid, in cumulus-oocyte complex in vitro maturation, more specifically in the process of cumulus expansion, and the possibility of transfering the technology to human assisted reproduction. In the present study, bovine oocytes were used as an experimental model. The cumulus-oocyte complexes (COCs) were aspirated from bovine follicles measuring 3-8 mm obtained from slaughterhouse ovaries and matured in TCM-199 supplemented with 10% serum, 5 mg / ml FSH, 0.5 mg / mL LH, with or without the addition of linoleic acid (LA) or phosphatidylcholine (PC) for 22h at 38.5 ° C in a humidified atmosphere of 5% CO2. The COCs were cultivated at a density of 1 CCO/10 µL of medium and immediately before and after IVM the cumulus expansion degree was evaluated. Each COC was photographed and the largest and smallest cumulus diameter was measured by a micrometer-calibrated ruler using a 5x optical zoom and the AxioVision software (Zeiss). The increase of cumulus diameter was analyzed by mixed-effects linear regression through the SAS 9.0 sotware using the PROC MIXED. The significance level was 5%. The present study showed that there was no reduction in the cumulus diameter of oocytes matured in vitro in medium containing 200 µM LA or 100 µM PC, compared with the diameters of the post-IVM COCs in control group. Subsequent evaluations will be instituted to expand the sample size and to correlate these findings with the expression of genes regulating the terminal maturation of CCO and cumulus expansion.

1. INTRODUÇÃO

Desde a constituição da unidade folicular no ovário, iniciada com a formação do folículo primordial, os processos de crescimento, desenvolvimento e aquisição de competência do oócito são dependentes de sua interação com as células da granulosa. O *cumulus oophorus* é definido como uma subpopulação de células da granulosa intimamente associadas entre si e diretamente interconectadas ao oócito no folículo antral, chamadas em seu conjunto de células do cumulus (CC). No folículo pré-ovulatório, a diferenciação terminal do *cumulus oophorus* desempenha um papel crucial na maturação do oócito e na aquisição do potencial para o desenvolvimento após a fertilização (TANGHE et al. 2002; GUTNISKY et al. 2007).

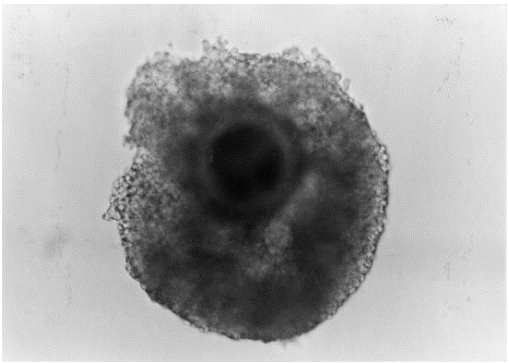


Figura 1. Complexo cumulus-oócito bovino imaturo. Fonte: Kruip & Wit (2001)

A maturação *in vitro* (MIV) consolidou-se como uma ferramenta promissora na tecnologia da reprodução assistida (TRA). A MIV tem aplicação no tratamento da infertilidade de perfis específicos de pacientes, como mulheres portadoras da síndrome dos ovários policísticos (SOP), e na preservação de fertilidade de pacientes jovens que precisam ser submetidas à quimioterapia, como técnica auxiliar associada à criopreservação de tecido ovariano e vitrificação de oócitos. Contudo, os resultados ainda são incipientes e os protocolos de maturação *in vitro* de oócitos humanos precisam ser revistos e otimizados. Além disso, avanços mais expressivos no desenvolvimento desta biotécnica são muitas vezes

postergados devido às implicações éticas/legais e disponibilidade de oócitos humanos para uso em pesquisa, advindos exclusivamente dos procedimentos de Fertilização *in vitro* (FIV). Alternativamente, oócitos e embriões bovinos têm sido utilizados em diversos estudos cujo objetivo final é a transferência de tecnologia para a TRA humana (FERREIRA et al., 2009a; VAN HOECK et al., 2011). A vaca é mono-ovulatória e oócitos bovinos e humanos são de tamanho semelhante e têm um metabolismo energético amplamente comparável (THOMPSON et al., 1996).

Estudos de lipidômica de oócitos e embriões de mamíferos destacaram recentemente a importância dos lipídios como fonte de energia, moléculas sinalizadoras e como constituintes das membranas biológicas e seu potencial impacto nas biotécnicas aplicadas à reprodução (FERGUSON; LEESE; 1999; HAGARTY et al., 2006; PEREIRA et al., 2007; FERREIRA et al., 2009b). Embora a técnica de maturação *in vitro* tenha sido exaustivamente investigada nas últimas décadas, o uso dos lipídios na suplementação dos meios de maturação de oócitos tem sido totalmente negligenciado. Alguns estudos sugerem a participação dos lipídios, mais especificamente os ácidos graxos, na maturação final do complexo cumulus-oócito durante o período periovulatório (MAREI et al., 2010; VAN HOECK et al., 2011). No entanto, a participação dos fosfolipídios neste processo ainda não foi estudada. Por essa razão, faz-se necessária uma investigação consistente da influência das diferentes classes de lipídios, como os ácidos graxos (AG) e os fosfolipídios (PL) na maturação *in vitro* do CCO, especificamente na expansão do *cumulus oophorus* e expressão de genes reguladores deste processo, visando contribuir para a determinação de possíveis marcadores de qualidade oocitária e para o aprimoramento dos protocolos de maturação *in vitro*.

1.1. Maturação *in vitro*

A maturação *in vitro* (MIV) é uma técnica laboratorial que visa obter de maneira artificial a maturação de oócitos (GONÇALVES et al., 2008). Durante a maturação, o oócito sofre diversas mudanças morfológicas e bioquímicas, com início na formação do folículo primordial até a ovulação, adquirindo a chamada competência oocitária a fim de ser viável para os eventos subsequentes da fecundação (BREVINI-GANDOLFI; GANDOLFI; 2001). No decorrer do processo de maturação o oócito sofre diversas alterações, inclusive um aumento de tamanho relacionado ao acúmulo de substâncias necessárias à maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário pré-implantação (EPPIG, 1994) e o incremento de seu conteúdo proteico (SCHULTZ; WASSARMAN; 1977). Ao longo de seu crescimento, os oócitos acumulam grandes quantidades de RNAs mensageiros (FEUERSTEIN et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2006), as células da granulosa multiplicam suas camadas e as células tecais se diferenciam do estroma circundante, e formam-se as junções *gap* entre o oócitos e as células da granulosa. Essas junções desempenham um importante papel no processo de maturação na interação do *cumulus oophorus* com o oócito.

A aquisição da competência oocitária envolve, além da maturação meiótica, uma série de alterações bioquímicas e estruturais, denominadas em seu conjunto de maturação citoplasmática (FERREIRA et al., 2009b). Contudo, os eventos moleculares relacionados à maturação *in vitro* de oócitos ainda não são totalmente conhecidos. Acredita-se que os transcritos e proteínas maternos estocados durante este período desempenham função importante no desenvolvimento embrionário precoce, uma vez que o genoma embrionário permanece quiescente até o quarto ciclo celular da embriogênese (MERMILLOD et al., 2000). No entanto, a participação de outras classes de moléculas como os lipídios na maturação oocitária *in vivo* e *in vitro* é pouco compreendida. Com relação ao citoplasma, o complexo de Golgi desenvolve-se, o retículo endoplasmático liso e as gotículas lipídicas

migram para a periferia da célula e há formação da zona pelúcida e grânulos corticais (VAN WEELER; RODGERS; 1996). Com isso, é evidente que é durante a maturação que ocorrem os principais eventos responsáveis por conferir competência oocitária, sendo necessário então o desenvolvimento de sistemas *in vitro* otimizados capazes de suportar o crescimento do oócito e assim ajudar a identificar os fatores essenciais para aquisição de competência do desenvolvimento e com isso garantir o sucesso nas etapas subsequentes (CHAVES et al., 2010).

Defeitos na maturação oocitária são causados por um processo inadequado de maturação nuclear ou citoplasmática, ou ambas, associado ao ambiente *in vitro*. São conhecidas diversas variáveis capazes de influenciar a maturação *in vitro* de oócitos: sistemas e meios de cultivo (MOOR et al., 1998; SAGIRKAYA et al., 2007; FERREIRA et al., 2009c; VIREQUE et al., 2011), macromoléculas sintéticas (CAIADO CASTRO et al., 2003; VIREQUE et al., 2009), soro/albumina (MINGOTI et al., 2000; SCHUETZ et al., 2004), esteróides (BEKER-VAN WOUDENBERG et al., 2006; MINGOTI et al., 2002) e gonadotrofinas (ANDERIESZ et al., 2006). Mais recentemente, os lipídios, representados predominantemente pelos triglicerídeos e ácidos graxos, têm sido investigados (FEGUSON; LEESE, 1999; MAREI et al., 2010; VAN HOECK et al., 2011).

Com isso, um dos principais focos de pesquisas acerca do assunto têm sido buscar técnicas inovadoras que permitam o aumento da eficiência do desenvolvimento dos oócitos cultivados *in vitro*. Majoritariamente procura-se estudar o efeito da adição de substâncias promotoras de crescimento ao meio de maturação e simular as condições intrafoliculares, de maneira a manter os oócitos em bloqueio meiótico através de inibidores de maturação nuclear, a fim de proporcionar um período de tempo maior para a aquisição da capacitação oocitária. Em relação aos meios de cultivo, pode-se dizer que o mais utilizado é o TCM-199 (tissue culture medium), um meio de fórmula complexa capaz de suprir as necessidades metabólicas

de células somáticas. Contudo, este meio não é específico para a maturação de CCOs, ou seja, ele não garante o suprimento total adequado para o metabolismo dessas células durante o cultivo na MIV, o que nos leva a uma das principais deficiências na tecnologia de MIV de oócitos. Com isso, são necessárias pesquisas com enfoque na melhoria do meio de maturação, buscando a adição de suplementos a fim de aumentar a qualidade dos oócitos cultivados *in vitro*. Comumente, adiciona-se uma fonte proteica ao meio (por exemplo soro fetal bovino ou albuma sérica bovina) e os hormônios LH e FSH. Além desses, utiliza-se estradiol, piruvato e gentamicina acrescidos ao meio TCM-199. Porém, a maturação *in vitro* de oócitos humanos não é suficientemente eficiente até o presente momento para fornecer um número satisfatório de oócitos competentes para a produção de embriões viáveis. A partir disso, faz-se necessário o conhecimento a fundo do metabolismo dos oócitos e das células do cumulus, focando nos diversos fatores de crescimento secretados tanto pelo oócito como pelas CCs que controlam as atividades do CCO, para que seja possível o desenvolvimento de um microambiente ideal capaz de fornecer todas as condições necessárias para a aquisição de competência do oócito e sua capacitação (MINGOTI; GOTTARDI; 2009).

1.2. Ácidos graxos e fosfolipídios

Os ácidos graxos (AG) são moléculas lipídicas constituidas de ácidos carboxílicos com uma longa cadeia lateral de hidrocarbonetos e são comumente encontrados na forma esterificada (reação química em que um ácido carboxílico reage com um álcool produzindo éster e água). Em plantas e animais superiores, os resíduos de ácidos graxos encontrados em maior abundância são os de 16 carbonos e de 18 carbonos, sendo eles: ácidos palmítico, oléico, linoleico e esteárico. Dentre os seres mencionados, mais da metade dos resíduos de ácidos graxos encontrados são insaturados (com ligação dupla), frequentemente poliinsaturados (com duas ou mais ligações duplas). Com relação aos ácidos graxos poliinsaturados, há duas classes de destaque, nomeadas ômega-3 e ômega-6 e os ácidos α-

linolênico e o ácido linoleico (LA) são os principais exemplos, respectivamente (VOET et al., 2008).

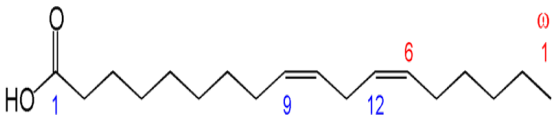


Figura 2. Estrutura química do ácido linoleico ou ácido 9-12-octadecadienoico. Contém 18 carbonos e duas insaturações, de fórmula química CH3-(CH2)4-CH=CH-CH2-CH=CH-(CH2)7COOH.

Os fosfolipídios (PL) compreendem uma classe especial de lipídios e são os componentes majoritários das membranas celulares. Há duas classes de fosfolipídios: os glicerofosfolipídios e as esfingomelinas. Os glicerofosfolipídios apresentam em sua estrutura o glicerol, ácidos graxos (AG), fosfato e um álcool. Ao glicerol são esterificados dois ácidos graxos nas posições C1 e C2 e um ácido fosfórico (figura 3). Os AG frequentemente encontrados nos glicerofosfolipídios têm entre 16 e 20 átomos de carbono. Os AG saturados ocorrem geralmente no C1 do glicerol. A posição C2 do glicerol é frequentemente ocupada por AG insaturados. O grupo fosfato em C3 une-se por ligação éster a um amino-álcool, como, por exemplo, a colina, $HOCH_2CH_2N(CH_3)_3$.

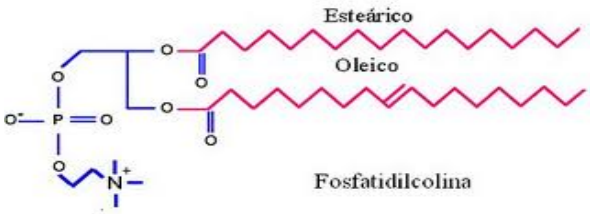


Figura 3. Estrutura química da fosfatidilcolina. Composta por uma colina, um grupo fosfato e um glicerol com a posição C1 ocupada por um AG saturado (esteárico) e a posição C2 ocupada por um AG monoinsaturado (oleico).

Os PL são moléculas anfipáticas, isto é, uma de suas extremidades é constituída pelo grupo fosfato e tem afinidade pela água (polar ou hidrofílica) e a outra é constituída pelas cadeias de ácidos graxos (apolar ou hidrofóbica). Essa característica é fundamental para a organização e propriedades biológicas da membrana plasmática e de todo o sistema de membranas da célula. Os PL modulam a funcionalidade das células por meio de sua incorporação nas membranas celulares (CLAMP et al, 1997; DE PABLO; CIENFUEGOS; 2000), principalmente em determinados *rafts* de membrana, microdomínios que funcionam como plataforma para iniciar a cascata de ativação celular (figura 4). Além da incorporação à membrana, os PL e AG podem modular respostas celulares pela ligação direta a receptores acoplados à família das proteínas G (BROWN et al, 2005) e são importantes fontes de moléculas sinalizadoras como o ácido araquidônico (AA) e segundos mensageiros intracelulares, como o inositol-3-fosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). Estes mecanismos de ação realçam o possível impacto dos lipídios no enriquecimento de meios para manipulação e cultivo de gametas e embriões.

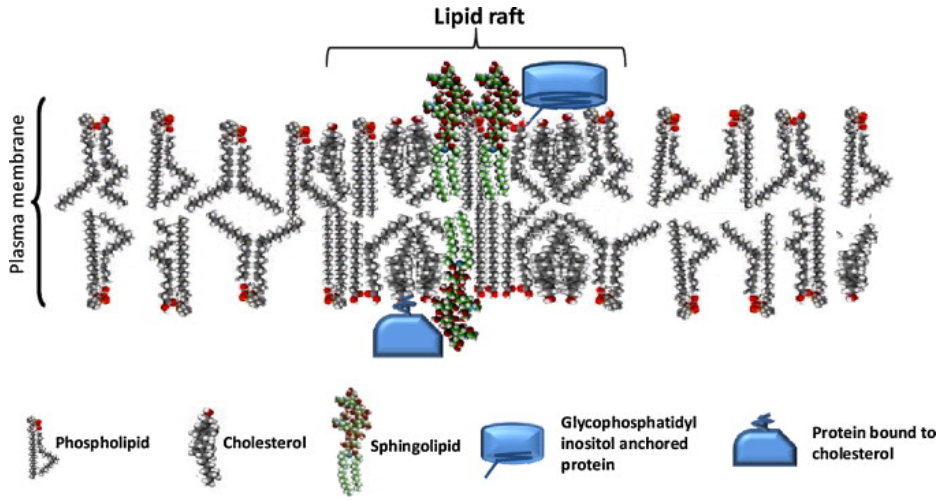


Figura 4. Microdomínios (*rafts*) da membrana plasmática. Os *rafts* são extremamente dinâmicos e formam domínios associados com esterol e esfingolipídeos que

compartimentalizam vários processos celulares, tornando a membrana menos fluida nessas áreas. Fonte: Tekpli et al., 2013. Toxicology 8:141-157.

1.3. Importância dos lipídios na maturação oocitária e desenvolvimento *in vitro*

Estudos do lipidoma de oócitos e embriões têm destacado os lipídios como moléculas promissoras para a suplementação de meios de cultivo (FERGUSON; LEESE; 1999; HAGARTY et al., 2006; FERREIRA et al., 2009b; MAREI et al., 2010; VAN HOECK et al., 2011). Além dos efeitos destas biomoléculas no metabolismo celular e como componentes estruturais da célula, sobretudo das membranas biológicas, a influência na modulação de criosensibilidade tem sido evidenciada em embriões bovinos (PEREIRA et al., 2007; TOMINAGA et al., 2000). Estudos utilizando o modelo bovino demonstraram que elevadas concentrações séricas de AG não esterificados refletem-se no fluido folicular do folículo pré-ovulatório (LEROY et al., 2005) e, deste modo, podem afetar diretamente a viabilidade das células da granulosa e esteroidogênese (JORRITSMA et al., 2004; VANHOLDER et al., 2005) assim como a competência oocitária (JORRITSMA et al., 2004; LEROY et al., 2005; AARDEMA et al., 2011). Tanto os ácidos α-linolênico e ácido linoleico são encontrados no plasma e no fluido folicular (CHILDS et al.; 2008), com isso estudos envolvendo a suplementação do meio de maturação da MIV de oócitos com esses AG foram desenvolvidos. Sabe-se que a suplementação com ácido α-linolênico na MIV de oócitos bovinos resultou em um aumento na taxa de maturação e maior produção e melhor qualidade de blastocistos (MAREI et al.; 2009). Contrariamente, oócitos expostos aos AG saturados durante a maturação *in vitro* apresentam diminuição da sua capacidade de desenvolvimento pós-fertilização, enquanto que na presença de ácido oleico, monoinsaturado, não há comprometimento da competência para o desenvolvimento Aardema et al., 2011; Wu et al., 2010). Em humanos, AG saturados, como o palmítico e esteárico, suprimem a sobrevivência das células da granulosa de maneira dose e tempo dependente (Mu et al., 2001), o que pode

comprometer a fertilidade. Um estudo *in vitro* testou a hipótese de que a presença de ácidos graxos (especificamente ácido palmítico, ácido esteárico e ácido oleico insaturado) no fluido folicular durante a maturação oocitária podem afetar a reserva lipídica do oócito e o desenvolvimento de sua capacidade pós-fertilização. O ácido palmítico e o esteárico apresentaram efeito inibidor dose-dependente da quantidade de lipídios estocados em gotículas lipídicas e um concomitante efeito comprometedor do desenvolvimento da capacidade oocitária. Por outro lado, o ácido oleico apresentou efeito completamente contrário, estimulando o aumento da reserva lipídica nas gotículas e melhora no desenvolvimento da capacidade oocitária. Notavelmente, os efeitos adversos dos ácidos palmítico e estárico podem ser neutralizados pelo ácido oleico, o que sugere que a proporção e a quantidade de ácidos graxos saturados e insaturados ministrada é relevante para o armazenamento lipídico do oócito em processo de maturação e, consequentemente, está relacionada ao desenvolvimento da sua capacidade (AARDEMA et al., 2011).

Embriões humanos apresentam cerca de 62-77% de ácidos graxos saturados, sendo a metade deste conteúdo constituída por ácido palmítico. Entre os monoinsaturados, o oleico é o AG predominante, enquanto as frações de AG polinsaturados são constituídas pelo linoleico, araquidônico e docosahexaenoico (DHA) (HAGGARTY et al., 2006). As proporções de AG saturados e insaturados mudam com o *time course* do desenvolvimento embrionário, observando-se alto teor de AGs insaturados e redução na abundância de AGs saturados em embriões viáveis e um *uptake* preferencial pelo ácido linoleico (HAGGARTY et al., 2006). Estes achados indicam fortemente o impacto do perfil lipídico no programa de desenvolvimento de oócitos e embriões.

Os efeitos dos lipídios na reprodução também tem sido relatados em estudos sobre a performance reprodutiva de bovinos leiteiros e podem ser parcialmente mediados por mudanças no microambiente do fluido folicular, uma vez que a taxa de ácidos graxos no

fluido folicular é correlacionada com o conteúdo e tipo destes ácidos presentes na dieta (CHILPDS et al., 2008; FOULADI-NASHTA et al., 2009). Alterações na composição de ácidos graxos no fluido folicular mediam o efeito dos ácidos graxos polinsatudados no oócito em desenvolvimento. Estas alterações podem influenciar o grau de expansão das células do cumulus e a maturação nuclear no oócito, os quais são críticos para o desenvolvimento do oócito após a fertilização (MAREI et al., 2010). Neste estudo foram avaliados os efeitos da suplementação do meio de MIV com diferentes concentrações de ácido linoleico durante um período de 24 horas em oócitos bovinos. Foi constatada assim uma relação dose-dependente do suplemento nos diferentes tratamentos. O grau de expansão nesse caso foi determinado de maneira qualitativa, uma vez que os CCOs foram classificados morfologicamente de acordo com o grau de expansão do cumulus em: não expandido, parcialmente expandido e totalmente explandido. Em seus resultados, detectaram que quanto maior a dose de LA adicionado,menor a porcentagem de CCOs apresentando total expansão. Dessa forma, faz-se necessário um estudo mais aprofundado sobre o assunto e capaz de expor os resultados através de parâmetros quantitativos, proporcionando uma análise mais precisa sobre a influência do LA no processo de expansão da células do cumulus.

1.4. Expansão do *cumulus oophorus*

O processo de expansão do cumulus é um evento crítico para a fertilidade. Em resposta ao pico pré-ovulatório de gonadotrofinas o oócito retoma a meiose e as CCs iniciam a secreção de ácido hialurônico, o qual é depositado entre os espaços intercelulares e estabilizado por proteínas acessórias. A formação da matriz rica em ácido hialurônico promove um aumento significativo no volume do CCO referido como expansão do cumulus (TANGHE et al., 2002). A enzima responsável pela síntese do ácido hialurônico no CCO é a hialuronato sintase e o processo de expansão do cumulus é regulado diretamente pelo FSH e por fatores parácrinos secretados pelo oócito, como o fator de crescimento e diferenciação-9

(GDF-9) e a proteína óssea morfogenética-15 (BMP-15) (D'ALESSANDRIS et al., 2001). Participam das vias de sinalização intracelular as prostaglandinas, a ciclooxigenase 2 (COX2) e pentraxina 3 (PTX-3) (PARK et al., 2004; ASHKENAZI et al., 2005). Embora seja um processo fisiológico facilmente reproduzido *in vitro*, o significado funcional da expansão do cumulus durante a MIV ainda não está totalmente elucidado, havendo diferenças espécies-específicas e controvérsias acerca da importância deste processo na maturação citoplasmática e aquisição de competência do oócito para o desenvolvimento (CHOI et al., 2001; SIRARD, 2001). A questão do diâmetro do cumulus oophorus e sua qualidade enfrenta escassez de informações na literatura, sendo estudada a competência oocitária de modo indireto, correlacionado a interação entre o diâmetro do folículo e a qualidade do cumulus oophorus. Bedirian e Baker (1975) realizaram um trabalho o qual classificaram os oócitos em 3 categorias segundo o aspecto do *cumulus oophorus*: compacto, expandido e degenerado. Neste estudo, observaram que 73% dos oócitos com cumulus compacto não concluíram a maturação nuclear, permanecendo no estágio de vesícula germinativa, enquanto aqueles com cumulus expandido obtiveram grande sucesso na maturação sendo que 81% deles a completaram. Entre aqueles com cumulus degenerado, 47% apresentou degeneração na cromatina e por isso são incapazes de completar a maturação. Fukui e Sakuma (1980) concluiram em seu estudo sobre as relações entre a atividade ovariana, tamanho do folículo e a presença ou ausência de células do cumulus na MIV de oócitos bovinos que a presença das CCs em torno do oócito parecem apresentar maior importância para a maturação *in vitro* até a metáfase II do que a atividade ovariana e o tamanho do folículo o qual o oócito foi aspirado. Ainda, Zhang et al. (1995) em seu estudo sobre influência da presença do cumulus oophorus nos processos de maturação do oócito, fertilização *in vitro* e desenvolvimento dos embriões gerados concluíram que a remoção das células do cumulus antes do processo de MIV

reduziram significativamente as taxas de sucesso, em porcentagem, de todos os processos avaliados.

Na maioria dos mamíferos, as CCs envolvem o oócito no momento da fertilização e a remoção dessas células implica em queda da taxa de fertilização. Embora ainda não seja conhecida a interação das CCs com o oócito ou os espermatozóides na promoção da fecundação há algumas sugestões acerca deste tema. Primeiramente, as células do cumulus podem atuar de maneira a aprisionar, mecanicamente, os espermatozóides e guiar aqueles hiperativados até o oócito, enquanto previne aqueles anormais de penetrar na matriz do cumulus. Ainda, as CCs criam um microambiente para o espermatozóide, favorecendo sua capacitação e penetração no oócito. Finalmente, as CCs previnem alterações na zona pelúcida ou no citoplasma que seriam desfavoráveis à fertilização (TANGHE et al., 2002).

Sabe-se que em ruminantes as CCs desprendem-se do oócito entre poucas horas até 10 horas após a ovulação (HYTTEL et al., 1988), porém oócitos bovinos desnudos coletados cirurgicamente poucas horas após a ovulação já não são mais férteis (BOUTERS et al.; 1983). Em hamster, o sucesso da fertilização *in vivo* cai ao compararmos oócitos desnudos com oócitos com cumulus intacto transferidos para animais acasalados (MOORE; BEDFORD; 1978). Contudo, é preciso analisar o papel desempenhado pelas células em questão durante a fertilização *in vitro*, se são igualmente importantes assim como observado *in vivo*. Durante o processo da FIV, o qual promove-se o encontro de oócitos e espermatozóides em placa de Petri, as células do cumulus acentuam claramente a taxa de sucesso da fertilização na maioria dos mamíferos. A remoção das CCs antes da FIV em experimentos de Zhang et al. (1995) e de Tajik et al. (1993) mostrou queda na penetração do espermatozóide no oócito em bovinos. O mesmo ocorre em suínos (WANG et al., 1995; SUZUKI et al., 2000). Por outro lado, em ratos demonstrou-se que a remoção do cumulus não afetou a taxa de fertilização (VERGARA et al., 1997), mostrando assim que esta é uma questão variável entre espécies. No advento da

fertilização, as conexões entre o oócito e as células do cumulus são interrompidas, porém o oócito ainda permanece imerso na matriz de proteoglicana e está cercado pelas células da corona e células do cumulus desprendidas (TANGHE et al., 2002).

As junções do tipo *gap* são as que conectam as células do cumulus e, assim, permitem a rápida tranferência de metabólitos de pequeno calibre e de moléculas regulatórias para o oócito. Paralelamente, essa propriedade das CCs bem como seu metabolismo específico são de suma importância no processo de regulação da maturação oocitária. As células do cumulus possuem função também de manter o oócito sob bloqueio da meiose (DEKEL, 1988; EPPIG, 1989), participam na indução da meiose através da condução do sinal de LH ao oócito (MATTIOLI; BARBONI; 2000) e são responsáveis pela maturação citoplasmática adequada do oócito (STAIGMILLER; MOOR; 1984; MORI et al., 2000).

Finalmente, há ainda a possiblidade de que as células do cumulus atuem prevenindo alterações oocitárias desfavoráveis à fertilização. Essas alterações incluem, por exemplo, a exocitose prematura dos grânulos corticais, onde como consequência observa-se endurecimento da zona pelúcida, prejudicando a fertilização. Em estudos com ratos, o *cumulus oophorus* foi removido durante a maturação oocitária, o que resultou em maior resistência da zona pelucida à digestão proteolítica e à penetração do espermatozóide (DOWNS et al., 1986). Em suínos, a remoção das CCs culminou em reação cortical prematura (GALEATI et al., 1991). Sendo assim, esses estudos evidenciam a hipótese de que o *cumulus oophorus* auxilia na prevenção do endurecimento da zona pelucida. Contudo, estudos em bovinos questionam a ocorrência do endurecimento da zona pelucida e ainda que este não influenciaria na penetração do espermatozóide depois da maturação de oócitos tanto desnudos como com o cumulus intacto (CHIAN et al., 1994). Recentemente, foi sugerida uma ação modulatória do cumulus oophorus no perfil lipídico de oócitos, prevenindo efeitos

lipotóxicos durante exposição do oócito à altas concentrações de AG livres, principalmente AG saturados (AARDEMA et al., 2013).

1.5. Genes reguladores da expansão do cumulus oophorus

1.5.1. Ciclooxigenase 2 (COX-2)

O mecanismo de expansão do cumulus está associado à indução da expressão da COX2 ou prostaglandina sintetase 2 (PTGS2), que é codificada pelo gene *PTGS2*, da hialuronato sintase 2 (HAS2), da proteína indutora do fator de necrose tumoral 6 (TSG6) e da pentraxina 3 (PTX3), sendo que esses genes são considerados críticos para o remodelamento da matriz extracelular no CCO e para a ruptura do folículo *in vivo* (PARK et al., 2004; ASHKENAZI et al., 2005; SHIMADA et al., 2006). A COX2 é uma enzima responsável pelo controle da síntese de prostaglandinas (PG), por exemplo, a PGE2. Essa enzima é produzida pelas células do cumulus e células da granulosa murais e, deste modo, é necessária para a completa expansão do cumulus e para o processo de ovulação (LIM et al., 1997). São encontradas duas isoformas da enzima COX2 em ovários de mamíferos já identificas, são elas: COX1, expressa de forma constitutiva nas células da teca; e a COX2, cuja expressão é induzida pelo LH nas células da granulosa murais e nas células do cumulus (OCHSNER et al., 2003). Continuamente, durante o período pré-ovulatório a produção de PGs derivadas da COX2 é crítica para a expansão do cumulus e maturação do oócito (HIZAKI et al., 1999). Foi demonstrada também uma função da PGE2 no estímulo da expansão do cumulus *in vitro* em camundongos e bovinos (EPPIG. 1981; CALDER et al., 2001). Em adição, a PGE2 estimulou a progressão do ciclo celular durante a maturação do oócito *in vitro* e o desenvolvimento embrionário inicial em bovinos (NUTTINCK et al., 2011). Foi demonstrado também que em camundongos a diminuição da atividade da COX2 compromete a expansão do cumulus, a completa maturação do oócito e a ovulação (LIM et al., 1997; DAVIS et al.,

1999). Alterações na atividade da PTGS2 resultam em defeitos no processo de expansão do cumulus, na conclusão do processo maturacional do oócito e falha severa na fertilização (LIM et al., 1997), o que realça a importância do gene PTGS2 como um possível marcador de qualidade oocitária.

1.5.2. Pentraxina 3 (PTX3)

A PTX3 desempenha função essencial para a estabilidade da matriz do cumulus oophorus. Em humanos e em camundongos, o RNAm da PTX3 é estimulado nas células do cumulus imediatamente antes da ovulação (VARANI et al., 2002; SCARCHILLI et al., 2007). Nos camundongos com deficiência de PTX3 foi observada instabilidade na matriz expandida e infertilidade (VARANI et al., 2002; SCARCHILLI et al., 2007).

1.5.3. Fator de crescimento diferenciação 9 (GDF-9)

Fatores secretados pelo oócitos como o GDF-9 são necessários para a expansão do cumulus (SUTTON et al., 2003). Os genes GDF9 e BMP15 foram demonstrados como importantes reguladores da proliferação, esteroidogênese, apoptose e expansão das células do cumulus, além de favorecerem a competência do oócito para a fecundação e desenvolvimento embrionário (EPPIG, 2001; GILCHRISTil et al., 2004; JUENGEL et al., 2004; HUSSEIN et al., 2006; YEO et al., 2008; HUSSEIN et al., 2011). Além disso, foi constatado que a expressão alterada ou bloqueada desses fatores leva a danos severos à função ovariana e à fertilidade (MCNATTY et al., 2004; GILCHRIST et al., 2004) e que a qualidade dos oócitos humanos está relacionada à transcrição abundante de genes específicos GDF-9 alvo nas células do cumulus (MCKENZIE et al., 2004).

2. OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência da suplementação do meio de MIV com fosfolipídio e ácido graxo no processo de maturação terminal do complexo cumulus-oócito (correspondente à fase periovulatória) baseando-se no grau de expansão mensurado das células do *cumulus oophorus*, visando à transferência de tecnologia para a Reprodução Assistida Humana. Posteriormente, será avaliada também a influência dos fosfolipídios na expressão dos genes *PTX3, COX2 e GDF9* nas células do cumulus e nos oócitos maturados *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Padronização de técnicas e experimento piloto

Para o desenvolvimento da pesquisa foram inicialmente realizados treinamentos nas biotécnicas aplicadas à reprodução. O plano de atividades proposto consistiu no preparo de meios de cultura, alíquotas de reagentes e soluções tampão, aspiração folicular *in vitro* de oócitos bovinos (OPU – ovum pick-up), seleção morfológica de oócitos, maturação *in vitro* e preparo de oócitos e células do cumulus para extração de RNA. Concomitantemente, foram padronizadas as técnicas de cultivo individual de oócitos para MIV e oocitectomia e realizado um experimento piloto para definir o delineamento experimental. A leitura prévia do protocolo de MIV e técnicas correlatas, bem como as checagens prévias de equipamentos, material descartável e soluções necessárias para as etapas da MIV e pós-MIV também foram objetos deste estudo piloto, visando um planejamento cuidadoso dos procedimentos e a qualidade da pesquisa, bem como a aquisição de destreza e rapidez na manipulação dos oócitos, evitando-se perda de repetições dos experimentos.

Complexos cumulus-oócitos (CCOs; n= 90) foram maturados individualmente (1 CCO/10 µL) em TCM suplementado com 10% soro, FSH (0,5µg/ml), LH (5 µg/mL) e

estradiol (1 µg/ml) na ausência (controle; n=30) ou presença de ácido linoleico (LA; n= 30) ou fosfatidilcolina (PC; n=30) nas concentrações de 200 µM e 500 µM, respectivamente, durante 24 h em atmosfera úmida, 5% de CO2, 38,5 °C. Para mensurar o grau de expansão do cumulus, cada CCO foi medido pré e pós-MIV (18h, 20h, 22h e 24h) utilizando o programa AxioVision. Dados de 3 repetições foram analisados por ANOVA seguido do teste de Tukey.

3.2. Delineamento Experimental

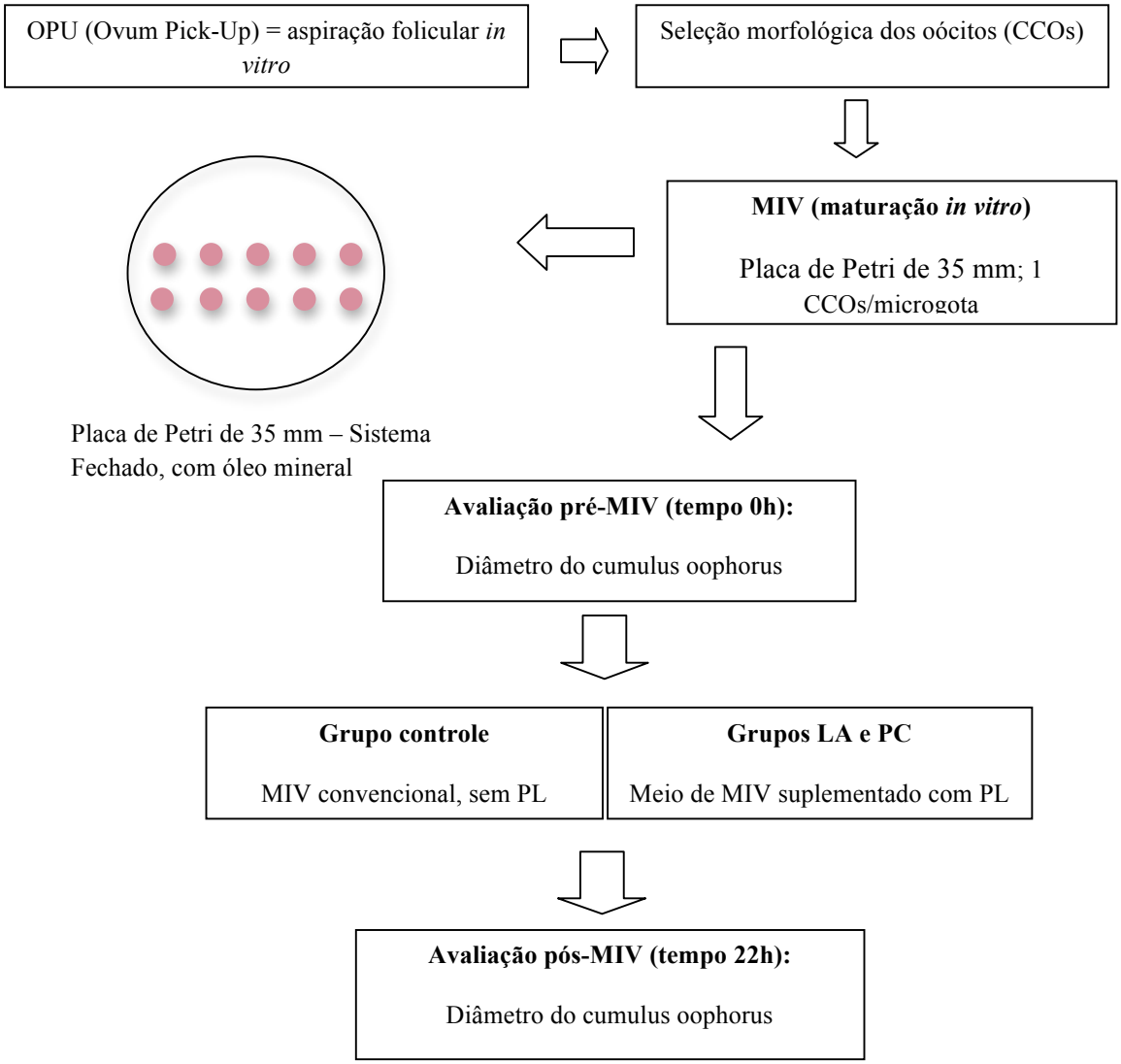


Figura 5. Esquema do delineamento experimental

Os CCOs foram aspirados *in vitro*, selecionados morfologicamente e transferidos individualmente para as microgotas na placa de MIV. Em seguida, cada CCO foi medido com auxílio do software Axiovision acoplado a estereomicroscópio Zeiss Stemi 2000-C. Após 18, 20, 22 e 24 horas de MIV, o diâmetro dos CCOs foi novamente mensurado, cada CCO foi submetido ao processo de oocitectomia e o oócito e respectivas células do cumulus armazenados em freezer -80°C para posterior análise de expressão gênica (figura 5).

3.3. Procedimentos para a maturação *in vitro*

3.3.1 Obtenção dos ovários

Foram utilizados ovários de vacas abatidas em matadouro (figura 6). Imediatamente após o abate e evisceração, os ovários foram removidos e imersos em solução fisiológica a 35-37 ºC, acrescida de penicilina e estreptomicina (SIRARD; BILODEAU; 1990). Posteriormente, levados ao laboratório, lavados em solução fisiológica pré-aquecida na temperatura de 35-37º e mantidos nesta mesma solução, em banho-maria, durante a aspiração dos folículos ovarianos.

Figura 6. Ovários bovinos coletados em frigorífico local. Observar os folículos ovarianos na região cortical.

3.3.2. Aspiração, manipulação e seleção dos oócitos

Foram selecionados folículos com 3-8 mm de diâmetro, boa vascularização e coloração do fluido folicular. A aspiração dos oócitos foi realizada com agulhas 25x7, adaptadas em seringas de 10 mililitros. Ao serem puncionados os folículos, o fluído folicular é aspirado e depositado em cálice cônico mantido à temperatura de 38 ºC (figura 7).

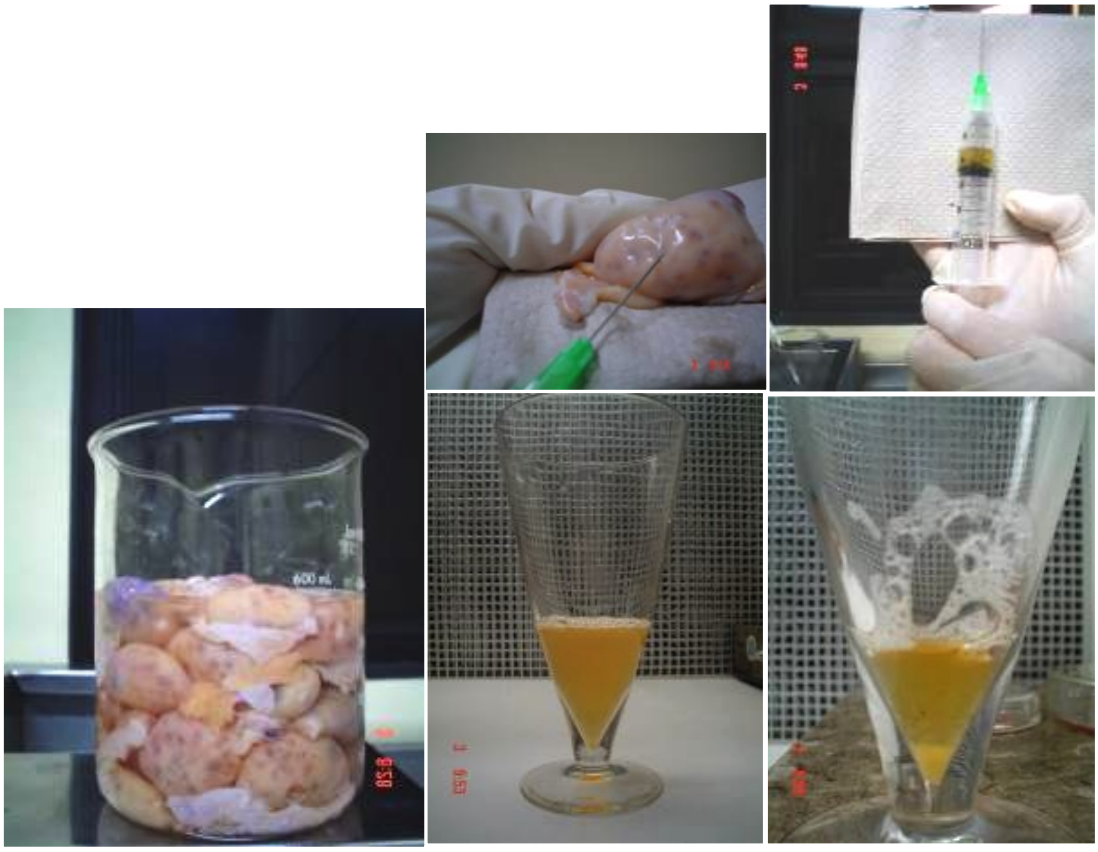


Figura 7. Procedimento de aspiração *in vitro* de oócitos bovinos (OPU) e fluido folicular recém-aspirado contendo os oócitos imaturos.

Após a decantação por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido com meio Talp-Hepes e transferido para placa de Petri mantida em placa aquecedora na temperatura de 38,5ºC. Os oócitos imaturos então foram selecionados para a maturação *in vitro* utilizando-se os seguintes parâmetros: 1. Aspecto do ooplasma: deu-se preferência aos oócitos com citoplasma uniforme, de coloração marrom e sem pigmentações

escuras; 2. Aspecto das células do *cumulus oophorus*: foram selecionados os oócitos apresentando várias camadas de células compactas, uniformes e sem pigmentações. Os complexos cumulus-oócitos foram lavados por meio do transporte destes para uma nova placa de Petri contendo meio Talp-Hepes, com auxílio de micropipeta. Em seguida, os oócitos foram lavados novamente em meio de maturação suplementado ou não com fosfolipídio e transferidos para placa de MIV.

3.3.3. Meio de cultivo padrão para maturação in vitro

Meio de maturação padrão TCM-199 (figura 8) com sais Earle e bicarbonato (Invitrogen, Life Techonogies Inc., Grand Island, NY), suplementado com 0,2 mM de piruvato, 100 UI/ml de Penicilina, 0,1 mg/ml de Estreptomicina, 0,5 µg/ml de FSH, 5,0 µg/ml de LH e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). No grupo Controle, não houve adição de nenhum suplemento. Nos grupos PL foram adicionados: fosfatidilcolina (grupo PC) a 100 µM e ácido linoleico (gr upo LA) a 500 µM.Os oócitos foram maturados individualmente em microgotas de 10 µl cobertas com óleo mineral em placa de Petri a 38,5°C, 95% de umidade, 5% de CO_2 em ar, por um período de 22 horas.

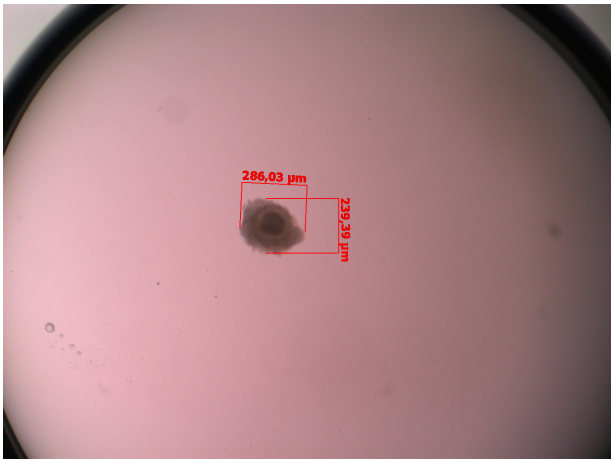
Figura 8. Meio TCM 199 usado na maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

3.4. Mensuração do diâmetro do cumulus

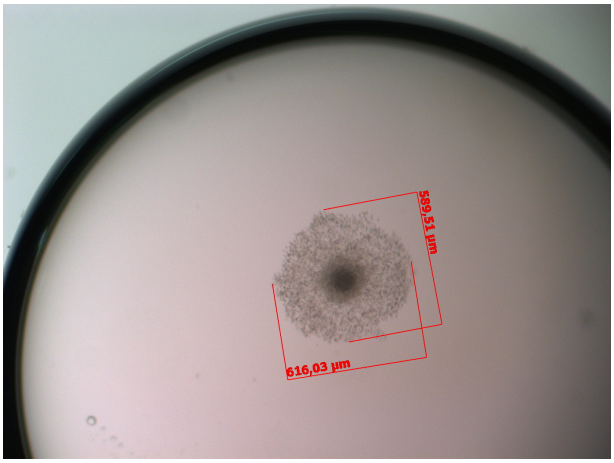
Imediatamente antes da MIV (tempo 0h) os oócitos foram microfotografados e o maior e menor diâmetros de cada CCO foram medidos com auxílio de uma régua

micrométrica calibrada usando objetiva de 0,1 mm (Nikon) e o software Axio Vision (Axio Scope A1; FV 1000-ASW 1.4.3; Olympus, Corporation, Japan) e calculada a média das duas medidas obtidas (figuras 9A e C). Após a MIV, o diâmetro do cumulus foi novamente mensurado nos respectivos CCOs para determinação do grau de expansão (Figura 9B e D).

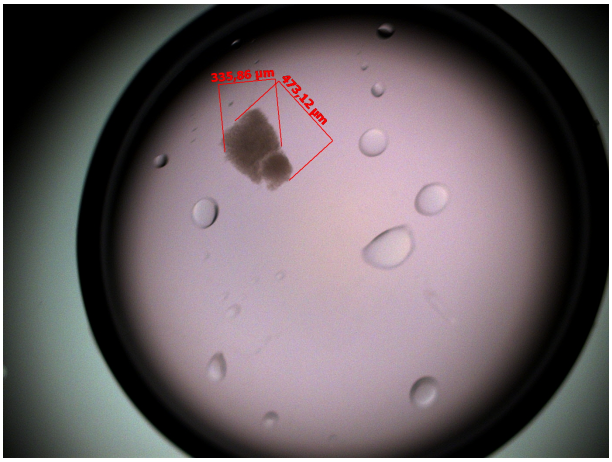
Pré MIV



Pós-MIV



Pré-MIV



Pós-MIV

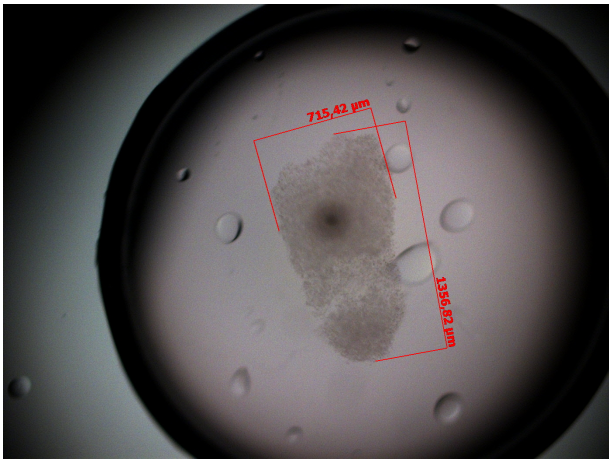


Figura 9. Determinação do diâmetro de complexos cumulus-oócito (CCO) bovinos nos tempos 0h (pré-MIV) e 22h (pós-MIV). Em A e B oócito com cumulus oophorus simétrico. Em C e D, exemplo de cumulus oophorus assimétrico. Foram medidos o maior e menor diâmetro de cada CCO e calculada e média.

3.5. Procedimentos Pós-MIV

Passado o período de 22 horas de maturação, os oócitos foram transferidos para placas de Petri contendo microgotas de meio tampão de lavagem PBS acrescido de PVP-40 (polivinilpirrolidona) e submetidos ao procedimento de oocitecmia. O oócito foi separado das CCs por meio de micromanipulacão com auxílio de agulha acoplada em seringa de insulina (BD) em. As células do cumulus foram então lavadas em PBS + PVP-40 e armazenadas em tubos Eppendorf para o congelamento. Os CCOs maduros foram ainda mecanicamente desnudados com auxílio da ação da enzima hialuronidase adicionada ao meio a fim de retirar totalmente as células do cumulus restantes, posteriormente foram ainda lavados em meio PBS e então armazenados.

Os oócitos e as células do cumulus foram congelados individualmente e estocados em freezer -80ºC acrescidos de 20 µL de solução de tampão PBS com RNA later em proporção 3:2, respectivamente, para posterior extração de RNA e análise por PCR em tempo real. Os procedimentos relacionados à análise de expressão gênica serão realizados em parceria com o

Laboratório de Morfofisiologia Molecular do Desenvolvimento - FZEA/USP sob a responsabilidade do Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles.

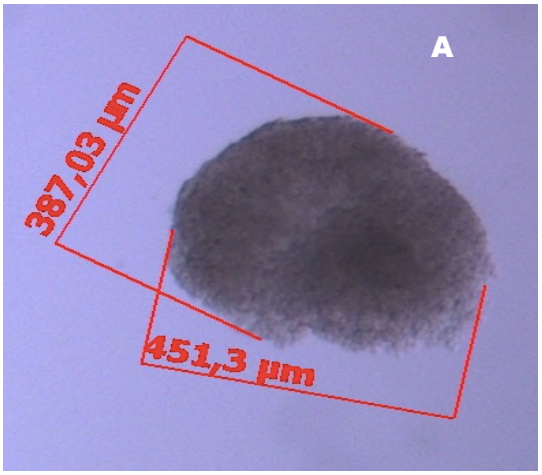
3.6. Análise estatística

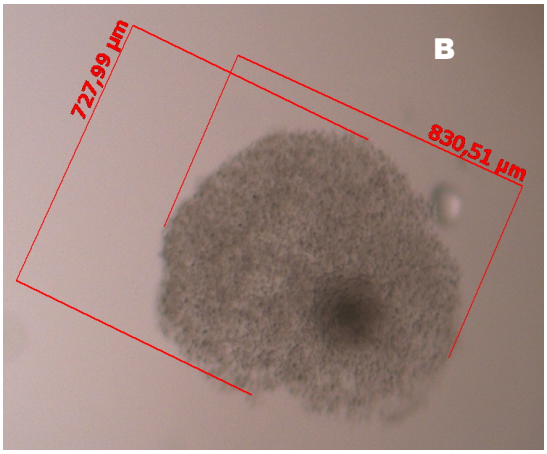
Resultados das medidas de diâmetro do cumulus oophorus foram analisados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey conforme procedimento do programa JMP versão 3.2 (SAS Institute Inc, 1985). Adicionalmente, foi analisado o percentual de aumento do diâmetro (expansão do cumulus) utilizando o modelo de regressão linear de efeitos mistos através do software SAS 9.0, utilizando a PROC MIXED. O nível de significância adotado foi de 5%, com o resultado das variáveis expresso em média e desvio-padrão.

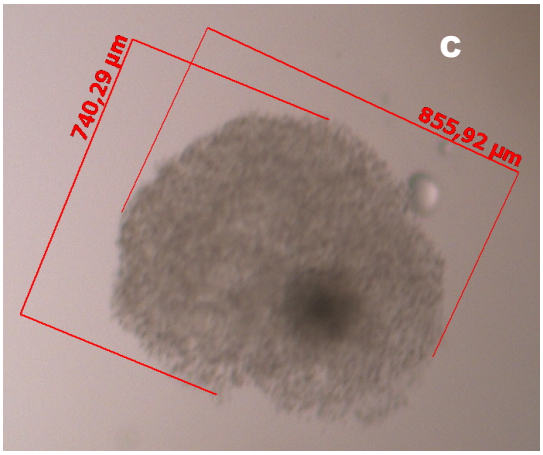
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

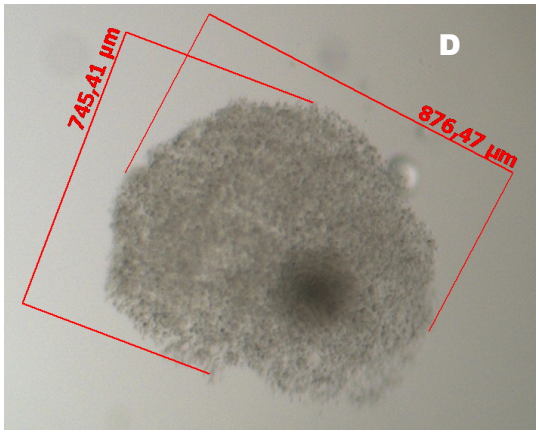
4.1. Experimento Piloto:

Foram realizadas 3 repetições dos experimentos (n=90). Não houve diferença significativa no grau de expansão do cumulus de CCOs tratados com LA quando comparados aos CCOs controles (333,6 ± 74,6 e 391,7 ± 134,7, respectivamente). No entanto, CCOs tratados com PC apresentaram redução na expansão do cumulus após 24h de MIV (319,7 ± 81,2; $p<0,05$), o que pode estar associado à alta dose utilizada de 500 μM. O *time course* da expansão do cumulus, avaliado após o oócito ter completado a maturação meiótica, não apresenta variação proeminente após 22 e 24h de MIV (figura 10).


A
387,03 µm
451,3 µm


B
727,99 µm
830,51 µm


C
740,29 µm
855,92 µm



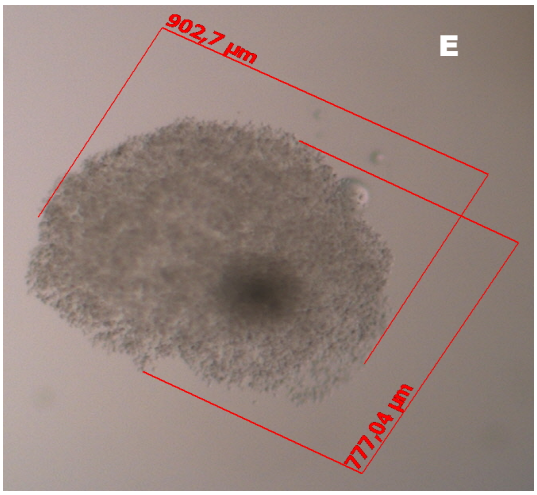


Figura 10. Expansão do cumulus oophorus de oócitos bovinos maturados *in vitro* na presença de ácido linoleico (LA) ou fosfatidilcolina (PC) pré-MIV (A) e após 18h (B), 20h (C), 22h (D) e 24 h (E) de maturação.

4.2. Determinação dos efeitos do LA e PC no grau de expansão do *cumulus ophorus* de oócitos bovinos

Neste experimento, foi mantida a dose de 200 µM do LA e avaliada a dose de 100 µM da PC. Os resultados das medidas de diâmetro do *cumulus oophorus* estão sumariados na tabela 1 e gráfico 1. Os diâmetros médios do CCO dos grupos LA e PC pré-MIV foram 369,7 µm e 346,8 µm (p>0,05), respectivamente. Após 22h de MIV, os diâmetros médios do CCO

dos grupos LA e PC foram 735,5 µm e 669,4 µm, diferindo estatisticamente ($p<0,05$). No entanto, não houve redução no diâmetro de *cumulus oophorus* de oócitos maturados *in vitro* em meio suplementado com LA a 200 µM ou PC a 100 µM, em comparação com os diâmetros pós-MIV dos CCOs controles (tabela 1). Importante ressaltar que não houve diferença estatística no diâmetro dos CCOs no tempo 0h entre o grupo tratado e seu respectivo controle ($p>0,05$).

Tabela 1. Diâmetro do *cumulus oophorus* de oócitos bovinos antes e após a maturação *vitro* em meio suplementado com ácido linoleico (LA) ou fosfatidilcolina (PC).

MIV	Grupo	N	Média	IC 95%		Mínimo	Mediana	Máximo	Valor p
				LI	LS				
0h	**Controle 1**	30	381,99	359,83	404,16	294,17	367,88	535,39	0,54
	LA	30	369,77	345,87	393,67	283,19	363,16	518,65	
	Controle 2	40	330,53	316,11	344,94	265,50	329,10	447,64	0,29
	PC	40	346,86	327,05	366,67	241,61	332,31	489,77	
22h	**Controle 1**	30	807,86	740,97	874,75	532,05	794,29	1258,26	0,09
	LA	30	735,53	687,48	783,58	485,92	724,51	1043,33	
	Controle 2	40	690,94	656,77	725,11	420,05	682,56	872,68	0,29
	PC	40	669,42	621,91	716,92	465,65	628,92	1018,75	

No entanto, observou-se diferença nos diâmetros do CCO entre os grupos controles 1 e 2. Os experimentos com os grupos LA e PC foram realizados em períodos distintos do ano, sendo o Controle 1 representativo dos meses que correspondem ao período inicial da seca, quando o impacto da estação no *status* nutricional dos animais e qualidade dos oócitos ainda não é proeminente, enquanto o Controle 2 representa o período de maior impacto do inverno na qualidade oocitária.

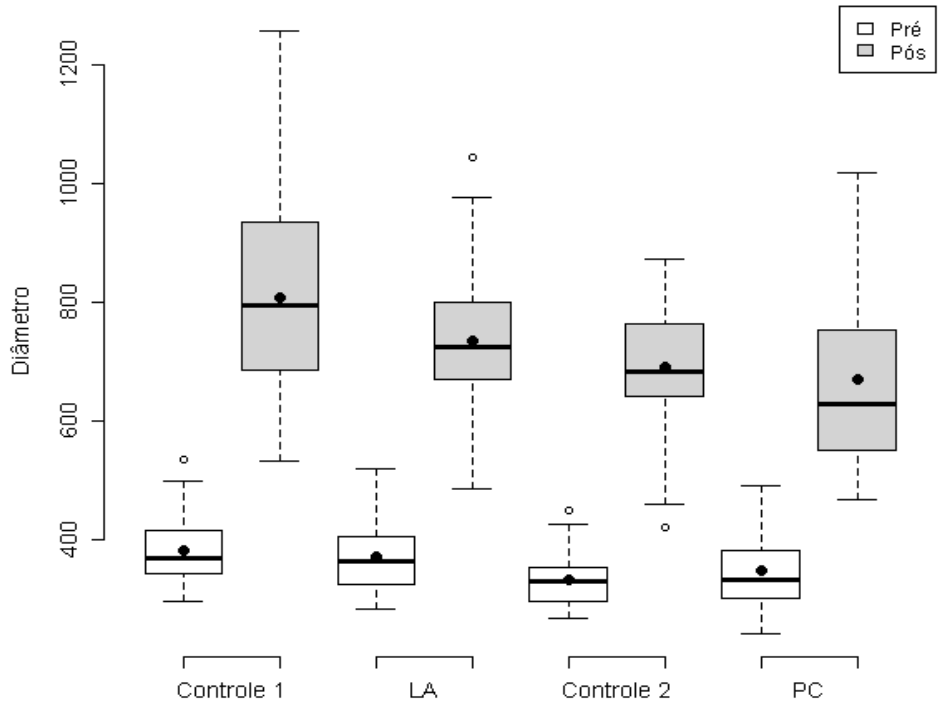


Gráfico 1. Diâmetro do cumulus de complexos cumulus-oócito (CCOs) bovinos antes (0h) a após a MIV (22h). LA = ácido linoleico; PC = fosfatidilcolina.

A comparação do percentual de expansão do cumulus entre os grupos experimentais demonstrou ausência de efeito dos dois lipídios estudados no grau de expansão das células do cumulus após a MIV, considerando a casuística e as doses utilizadas, não sendo observada diferença significativa entre os grupos LA e PC (tabela 2; gráfico 2).

Tabela 2. Percentual de aumento do diâmetro do *cumulus oophorus* de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com ácido linoleico (LA) ou fosfatidilcolina (PC).

Grupo	N	Média	IC 95%		Mínimo	Mediana	Máximo	Valor p
			LI	LS				
Controle 1	10	109,55	94,73	124,37	38,68	104,66	186,8	
LA	10	99,28	89,72	108,84	38,89	103,65	148,19	
Controle 2	10	115,26	103,04	127,49	32,27	108,17	222,04	
PC	10	94,91	84,57	105,25	36,53	87,63	190,33	

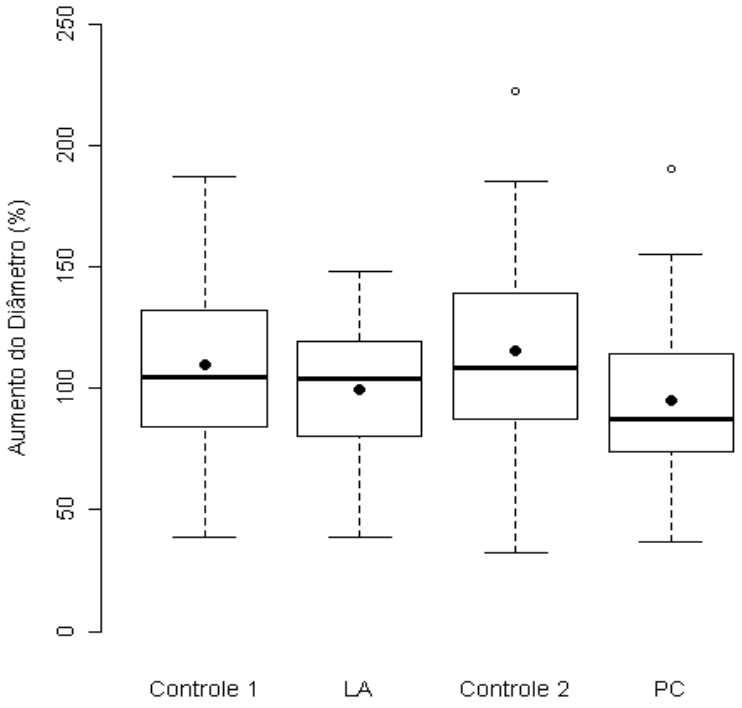


Gráfico 2. Percentual de aumento do diâmetro do cumulus oophorus de oócitos bovinos após 22 horas de MIV em meio suplementado com ácido linoleico (LA) ou fosfatidilcolona (PC).

A expansão do cumulus tem sido associada com várias funções do oócito incluindo a ovulação, clivagem e desenvolvimento embrionário (ZHANG et al., 1995; TANGHE et al., 2002). As células do cumulus também desempenham um papel importante durante a fertilização, estimulando a seleção e motilidade do espermatozoide (TANGHE et al., 2002). O grau de expansão do cumulus oophorus foi sugerido como um possível marcador de qualidade do oócito (BAR-AMI et al., 1989). No entanto, os dados disponíveis na literatura são escassos e as avaliações deste parâmetro nos estudos publicados são predominantemente qualitativas (MAREI et al., 2010; PERALTA et al., 2013).

Marei et al (2010) relatam bloqueio significativo na expansão do cumulus de oócitos bovinos maturados com LA na dose de 200 μM. Em seus estudos, é relatada ainda a alteração de mecanismos moleculares regulatórios da maturação oocitária, de forma que houve decréscimo na porcentagem de oócitos avaliados que chegaram até o estágio de metáfase II

(MII). Em conclusão, os autores afirmam que a suplementação com LA promoveu efeito adverso na maturação dos oócitos e este achado poderia ser associado ainda com a presença de grande quantidade de LA na dieta, tanto em bovinos como em humanos, refletindo no teor desse ácido no fluido folicular, diminuindo a fertilidade.

Segundo Whates et al. (2007), os ácidos graxos poliinsaturados n-6 e n-3 influenciam na reprodução por meio de vários mecanismos. Estes AGs fornecem os precursores para sínstese de prostaglandina e ainda são capazes de modular o padrão de expressão de uma série de enzimas envolvidas no metabolismo de prostaglandinas e esteróides, os quais desempenham diversas funções na regulação da reprodução. Além disso, a composição do AGs poliinsaturados presentes na membrana celular do oócito é importante no momento da fecundação. Contudo, pouco se saber sobre os efeitos desses AGs na fertilização, havendo teorias sobre possíveis efeitos tanto negativos quanto positivos. A via de sinalização intracelular envolvendo o inositol-3-fosfato (IP3) é importante para a regulação do processo de expansão do cumulus e poderia ser ativada a partir de metabólitos gerados pela PC e LA usados na suplementação do meio de MIV. No entanto, não observamos efeito destas biomoléculas no grau de expansão do cumulus durante a MIV.

Ademais, Marei et al. (2012) estudaram o efeito do uso de suplementação com LA e ALA (ácido linolênico) no padrão de distribuição das mitocôndrias e a presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) em oócitos bovinos. Os resultados mostraram uma alteração no padrão de distribuição das organelas em questão e ainda um aumento nos níveis de ROS no grupo tratado com LA, o que teria, pelo menos em parte, efeito inibidor no processo de maturação oocitária como um todo. Este fenômeno não foi observado no grupo tratado com ALA, o qual não apresentou influência da distribuição das mitocôndrias e diminuiu os níveis de ROS, o que foi associado com aumento na taxa de maturação nuclear.

No presente estudo, a mensuração do diâmetro de cada CCO individualmente, antes e após a MIV, bem como a análise adicional do percentual de expansão do cumulus, demonstra ausência de efeito do LA neste processo. Contudo, baseando-se somente nas medidas de diâmetro não podemos afirmar que não há interferência , uma vez que o evento da maturação envolve vias de sinalização celular e atividade gênica, sendo então necessária além da análise quantitativa da expansão do *cumulus oophorus* a análise em conjunto com a expressão de genes marcadores de qualidade oocitária, de forma a obter dados conclusivos sobre o assunto. Avaliações subsequentes serão instituídas para ampliar o número amostral e correlacionar estes achados com a expressão de genes reguladores da maturação terminal do CCO e expansão do *cumulus oophorus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARDEMA, H.; VOS P.; LOLICATO, F.; ROELEN, B.; KNIJN, H. M.; et al. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biol Reprod**. 2011;85: 62–69.

ASHKENAZI, H.; CAO, X.; MOTOLA, S.; POPLIKER, M.; CONTI, M.; TSAFRIRI, A. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. **Endocrinol**. 2005;146:77-84.

AUSTIN C. R.; WALTON A. Fertilization. In: Parkes, AS (ed.), **Marshall's Physiology of Reproduction**. 1960;1: 310-416. Longmans Green, London.

BEDFORD J. M. **The implications of unusual sperm: female relationships in mammals. In: Gagnon, C (ed.), The Male Gamete: from Basic Science to Clinical Applications**. Cache River Press, Vienna. 1999;81–92.

BEDFORD, J. M.; KIM, H. H. Cumulus oophorus as a sperm sequestering device in vivo. **J Exp Zool**. 1993;265:321–328.

BEDIRIAN, K. N., SHEA, B. F., BAKER, R. D. Fertilization of bovine follicular oocytes in bovine and porcine oviducts**. Can. J. Anim**. Sci. 1975;55:251-256

BOUTERS, R.; MOYAERT, I.; CORYN, M.; VANDEPLASSCHE M. The use of a PMSG antiserum in superovulated cattle: endocrinological changes and effects on timing of ovulation. **Reproduction in Domestic Animals**. 1983;18:172-177.

CALDER, M. D., CAVENEY, A. N., WESTHUSIN, M. E., WATSON A. Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 (PGE2) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte

maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE2 induces moderate expansion of the bovine cumulus in vitro. **Biol Reprod**. 2001;65:135–140.

CHIAN, R.C.; NIWA, K.; SIRARD, M.A. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes in vitro. **Theriogenology**. 1994;41:1499-1508.

CHILDS, S.; HENNESSY, A. A.; STANTON, C.; WATHES, D. C.; SREENAN, J. M.; DISKIN, M. G.; KENNY, D. A. Effect of dietary enrichment with either n-3 ou n-6 fatty acids on systemic metabolite and hormones concentration and ovarian function in heifers. **Animal**. 2008;2:883-893.

CHOI, Y.H.; CARNEVALE, E. M.; SEIDEL, J. R. G. E.; SQUIRES, E.L. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. **Theriogenology**. 2001;56:661-670.

D'ALESSANDRIS, C.; CANIPARI, R.; GIACOMO, M.D.; EPIFANO, O.; CAMAIONI, A.; SIRACUSA, G.; SALUSTRI, A. Control of Mouse Cumulus Cell-Oocyte Complex Integrity before and after Ovulation: Plasminogen Activator Synthesis and Matrix Degradation. **Endocrinology**. 2001;142(7):3033-3040.

DAVIS, B. J.; LENNARD, D. E.; LEE, C. A.; TIANO, H. F.; MORHAM, S. G.; WETSEL, W. C.; LANGENBACH, R. Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1b. **Endocrinology**. 1999;140: 2685-2695.

DEKEL N. Regulation of oocyte maturation. The role of cAMP. Ann N Y Acad Sci 1988;541:211–216.

DOWNS, S. M.; SCHROEDER, A. C.; EPPIG, J. J. The developmental capacity of mouse oocytes following maintenance of meiotic arrest in vitro. Gamete Res. 1986;15:305-16.

EISENBACH, M. Sperm chemotaxis. **Rev Reprod**. 1999;4: 56–66.

EPPIG, J. J. The participation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in the regulation of meiotic maturation of oocytes in the laboratory mouse. **J Reprod Fertil Supplement**. 1989;38: 3–8.

EPPIG, J. J.. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**. 2001;122:829-838.

EPPIG, J. J. Prostaglandin E2 stimulates cumulus expansion and hyaluronic acid synthesis by cumuli oophori isolated from mice. **Biol Reprod**. 1981;25:191–195.

FERGUSON, E. M.; LEESE H. J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos **E. M. J Reprod Fertil**. 1999;116:373-378.

FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. A. S. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I reversibly arrests meiosis without increasing meiotic abnormalities after in vitro maturation. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. 2009;145,:76–80.

FOULADI-NASHTA, A. A.; WONNACOTT, K. E.; GUTIERREZ, C. G.; GONG, J.G.; SINCLAIR, K. D.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. Oocyte quality in lactating dairy cows fed on high levels of n-3 and n-6 fatty acids. **Reproduction**. 2009;138(5):771-81.

FUKUI, Y.; SAKUMA, Y. Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: relation to ovarian activitty, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. Biology of Reproduction , **Champaign**. 1980;22:669-673.

GALEATI G.; MODINA S.; LAURIA A.; MATTIOLI M. Follicle somatic cells influence pig oocyte penetrability and cortical granule distribution. **Mol Reprod Dev**. 1991; 29, 40-46.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Anim Reprod Sci**. 2004;82-83:431-446.

HAGGARTY, P.; WOOD, M.; FERGUSON, E.; HOAD, G.; SRIKANTHARAJAH, A.; MILNE, E.; HAMILTON, M.; BHATTACHARYA, S.. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. Human Reproduction. 2006;21(3):766–773.

HIZAKI, H.; SEGI, E.; SUGIMOTO, Y.; HIROSE, M.; SAJI, T.; USHIKUBI, F.; MATSUOKA, T.; NODA, Y.; TANAKA, T.; YOSHIDA, N. Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP2**.** **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1999;96:10501-10506.

HUSSEIN, T. S.; SUTTON-MCDOWALL, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G.. Temporal effects of exogenous oocyte-secreted factors on bovine oocyte developmental competence during IVM. **Reprod Fertil Dev**. 2011;23:576–584.

HUSSEIN, T. S.; THOMPSON, J. G., GILCHRIST, R.B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence**. Dev Biol**. 2006;296:514–521.

HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructure of in-vivo fertilization in cattle. **J Reprod Fertil**. 1988;82, 1–13.

ITO M.; SMITH T. T.; YANAGIMACHI R. Effect of ovulation on sperm transport in the hamster oviduct. **J Reprod Fertil**. 19991;93: 157–163.

JORRITSMA, R.; CESAR, M. L.; HERMANS, J. T.; KRUITWAGEN, C. L.; VOS, P. L., et al. Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells and developmental potential of oocytes in vitro. **Anim Reprod Sci**. 2004;81:225–235.

JUENGEL, J. L.; BODENSTEINER, K. J.; HEATH, D. A.; HUDSONA, N. L.; MOELLER, C. L.; SMITH, P.; GALLOWAY, S. M.; DAVIS, G. H.; SAWYER, H. R.; MCNATTY, K. P. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. **Anim Reprod Sci**. 2004;82–83:447–460.

LEROY, J. L.; VANHOLDER, T.; MATEUSEN B.; CHRISTOPHE A.; OPSOMER G. Nonesterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. **Reproduction**. 2005;130: 485– 495.

LIM, H.; PARIA, B. C.; DAS, S. K.; DINCHUK, J. E.; LANGENBACH, R.; TRZASKOS, J. M.; DEY, S. K. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. **Cell**. 1997;91:197-208.

MAREI, W. F., WATHES, D. C., FOULADI-NASHTA, A. A. Differential effects of linoleic and alpha-linolenic fatty acids on spatial and temporal mitochondrial distribution and activity in bovine oocytes. **Reprod. Fertil**. 2012 Dev. 24, 679–690.

MAREI, W. F., WATHES, D. C., FOULADI-NASHTA, A. A. The effect of linolenic Acid on bovine oocyte maturation and development. Biol Reprod. 2009 Dec;81(6):1064-72. doi: 10.1095/biolreprod.109.076851. **Epub** 2009 Jul 8.

MAREI, W. F.; WHATES, D. C.; FOULADI-NASHTA, A. A. **Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development**. 2010.

MARTIN, C. A. et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Rev. Nutr., Campinas** , v. 19, n. 6,Dec. 2006. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732006000600011&lng=en&nrm=iso>. access on 20 Oct. 2013.

MATTIOLI M.; BARBONI B. Signal transduction mechanism for LH in the cumulus–oocyte complex**. Mol Cell Endocrinol**. 2000;161:19–23.

MCKENZIE L. J.; PANGAS S. A.; CARSON S. A.; KOVANCI E.; CISNEROS P.; BUSTER J. E. et al. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. **Hum Reprod**. 2004;19(12):2869-74.

MCNATTY, K. P.; MOORE, L. G.; HUDSON, N. L.; QUIRKE, L. D.; LAWRENCE, S. B.; READER, K.; HANRAHAN, J. P.; SMITH, P.; GROOME, N. P.; LAITINEN, M.; RITVOS, O.; JUENGEL, J. L. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. **Reproduction**. 2004;128:379-386.

MOORE, H. D. M.; BEDFORD, J. M. An in vivo analysis of factors influencing the fertilization of hamster eggs**. Biol Reprod**. 1978;19:879–885.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**, 8a ed., Elsevier, Rio de Janeiro, 2008.

MORI, T.; AMANO, T.; SHIMIZU, H. Roles of gap junctional communication of cumulus cells in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured in vitro. **Biol Reprod**. 2000;62:913–919.

MU, YM.; YANASE, T.; NISHI, Y.; TANAKA, A.; SAITO, M.; et al. Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells. **Endocrinology**. 2001;142:3590–3597.

NUTTINCK, F.; GALL, L.; RUFFINI, S.; LAFFONT, L.; CLEMENT, L.; REINAUD, P.; ADENOT, P.; GRIMARD, B.; CHARPIGNY, G.; GUIENNE, B. M. L. PTGS2-related PGE2

affects oocyte MAPK phosphorylation and meiosis progression in cattle: late effects on early embryonic development. **Biol Reprod**. 2011;84:1248–1257.

OCHSNER, S. A.; RUSSELL, D. L.; DAY, A. J.; BREYER, R. M.; RICHARDS, J. S. Decreased expression of tumor necrosis factor-α-stimulated gene 6 in cumulus cells of the cyclooxygenase-2 and EP2 null mice. **Endocrinology**. 2003;144:1008–1019.

PARK, J. Y.; SU, Y. Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S. L.; CONTI, M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science.** 2004;303:682-684.

PEREIRA, R. M; BATISTA, M. C.; VASQUES, M. I.; HORTA, A. E.; PORTUGAL, P. V.; BESSA, R. J.; SILVA, J. C.; PEREIRA, M. S.; MARQUES, C. C. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). **Anim Reprod Sci**. 2007;98(3-4):293-301.

SCARCHILLI, L.; CAMAIONI, A.; BOTTAZZI, B.; NEGRI, V.; DONI, A.; DEBAN, A. B.; SALVATORI, G.; MANTOVANI, A.; SIRACUSA, G.; SALUSTRI A. PTX3 interacts with inter-α-trypsin inhibitor. **J Biol Chem**. 2007;282:30161-30170.

SHIMADA, M.; HERNANDEZ-GONZALEZ, I.; GONZALEZ-ROBAYNA, I.; RICHARDS, J. S. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor**. Mol Endocrinol**. 2006;20:1352–1365.

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

SIRARD, M.A.; BILODEAU, S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes in vitro. **Biol Reprod**, v.43, n.5, p.777-783, 1990.

SMITZ, J.; NOGUEIRA, D.; ALBANAO, C.; CORTVRINDT, R.; DEVROEY, P.; 2001: Improving in vitro maturation of oocytes in the human taking lessons from experience in animal species. **Reprod Dom Anim** 36, 11–18.

STAIGMILLER, R. B.; MOOR, R. M. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. **Gamete Res**. 1984;9:221–229.

SUTTON-MCDOWALL, M. E.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity.**Hum Reprod Update**. 2003;9:35-48.

SUZUKI, K.; ERIKSSON, B.; SHIMIZU, H.; NAGAI, T.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. **Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized in vitro**. Int J Androl. 2000;23:13–21.

TAJIK, P.; NIWA, K.; MURASE, T. Effects of different protein supplements in fertilization medium on in vitro penetration of cumulus-intact and cumulus-free bovine oocytes matured in culture. **Theriogenology.** 1993;40:949–958.

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**. 2002;61:414–424.

THOMPSON, J. G.; PARTRIDGE, R. J.; HOUGHTON, F. D.; COX, C. I.; LEESE H. J. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. **J Reprod Fertil** 1996; 106:299-306.

TOMINAGA, K.; HAMADA, Y.; YABUUE, T.; ARIYOSHI, T. J. Effect of linoleic acid-albumin on post-thaw survival of in vitro-produced bovine embryos at the 16-cell Stage. **Vet. Med. Sci**. 2000;62(4): 465–467.

VAN HOECK, V.; STURMEY, R. G.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; et al. **Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology**. PLoS ONE. 2011;6(8): e23183. doi:10.1371/journal.pone.0023183

VARANI, S.; ELVIN, J. A.; YAN, C.; DEMAYO, J.; DEMAYO, F. J.; HORTON, H. F.; BYRNE, M. C.; MATZUK, M. M. Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. **Mol Endocrinol**. 2002;16:1154–1167.

VERGARA, M. H.; IRWIN, R. J.; MOFFATT, R.; PINKERT, C. A. In vitro fertilization in mice: strain differences in response to superovulation protocols and effect of cumulus cell removal. **Theriogenology.** 1997;47:1245–1252.

VOET, D; VOET, J. G.; PRATT C. W. Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WATHES, D.C., ABAYASEKARA, D.R., AITKEN, R.J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, 2007. 77 190–201.

WANG, W. H.; ABEYDEERA, L. R.; FRASER, R. L.; NIWA, K. Functional analysis using chlortetracyclin fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein free chemically defined medium. **J Reprod Fertil**. 1995;104:305–313.

WU, L. L.; DUNNING, K. R.; YANG, X.; RUSSELL, D. L.; LANE, M.; NORMAN, R.J.; ROBKER, R. L. High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus-oocyte complexes and decreased fertilization rates. **Endocrinology**, 2010; 151: 5438 5445.

WU, L. L.; RUSSELL, D. L.; NORMAN, R. J.; ROBKER, R. L. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress in Cumulus-Oocyte Complexes Impairs Pentraxin-3 Secretion, Mitochondrial Membrane Potential (ΔΨm), and Embryo Development. **Mol Endocrinol** 2012;26:562-573.

YEO, C. X.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G.; LANE, M. Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. **Hum Reprod**. 2008;23:67-73.

ZHANG, L.; JIANG, S.; WOZNIAK, P. J.; YANG, X.; GODKE, R. A. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. **Mol Reprod Dev**. 1995;40:338–344.

BOUTERS, R.; MOYAERT, I.; CORYN, M.; VANDEPLASSCHE M. The use of a PMSG antiserum in superovulated cattle: endocrinological changes and effects on timing of ovulation. **Reproduction in Domestic Animals**. 1983;18:172-177.