JULIANA DE CARVALHO DELGADO

**Influência do fator de crescimento fibroblástico 16 (FGF16) e da
proteína morfogênica óssea 15 (BMP15) na aquisição da
competência oocitária em bovinos**

São Paulo
2014

JULIANA DE CARVALHO DELGADO

**Influência do fator de crescimento fibroblástico 16 (FGF16) e da proteína
morfogênica óssea 15 (BMP15) na aquisição da competência oocitária em
bovinos**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Reprodução Animal
da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila
Assumpção

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3038
FMVZ

Delgado, Juliana de Carvalho
Influência do fator de crescimento fibroblástico 16 (FGF16) e da proteína morfogênica
óssea 15 (BMP15) na aquisição da competência oocitária em bovinos / Juliana de Carvalho
Delgado. -- 2014.
100 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção.

1. Maturação oocitária. 2. Bovinos. 3. Fatores de crescimento. 4. FGF16. 5. BMP15.
I. Título.

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência do Fator de Crescimento Fibroblástico 16 (FGF16) e da Proteína Morfogênica Óssea 15 (BMP15) na aquisição da competência oocitária em bovinos", protocolado sob o nº 2687/2012, utilizando nº indeterminado de ovários de fêmeas bovinas, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Mayra Elena D'Ávila Ortiz Assumpção, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/8/2012.

We certify that the Research "The influence of Fibroblast Growth Factor 16 (FGF16) and Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) in the acquisition of oocyte competence in cattle", protocol number 2687/2012, utilizing indeterminate number of ovaries of cows, under the responsibility Profa. Dra. Mayra Elena D'Ávila Ortiz Assumpção, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/15/2012.

São Paulo, 16 de maio de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: DELGADO, Juliana de Carvalho

Título: **Influência do fator de crescimento fibroblástico 16 (FGF16) e da proteína morfogênica óssea 15 (BMP15) na aquisição da competência oocitária em bovinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre em Ciências

DATA ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha amada irmã Tamie,
que se tornou a estrela mais brilhante do meu céu.

AGRADECIMENTOS

Juntos no ciclo da vida e do aprendizado.

Muito obrigada por tudo!

EPÍGRAFE

“Alguns infinitos são maiores que outros”

John Green, A culpa é das estrelas.

RESUMO

DELGADO, J. C. Influência do fator de crescimento fibroblástico 16 (FGF16) e da proteína morfogênica óssea 15 (BMP15) na aquisição da competência oocitária em bovinos. [The influence of fibroblast growth factor 16 (FGF16) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) in the acquisition of oocyte competence in cattle]. 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A resposta da produção *in vitro* de embriões (PIVE) é reduzida quando comparada à *in vivo*. O aprimoramento do conhecimento dos mecanismos de maturação de oócitos bovinos permite fornecer embasamento para incrementar os sistemas *in vitro*, aproximando-os do ideal fisiológico. O presente estudo visou investigar os efeitos da suplementação dos meios de maturação com FGF16 (10 ng/ml), BMP15 (100 ng/ml) e a interação de ambos sobre parâmetros relevantes ao desenvolvimento do complexo cumulus oócito (COC), tais como: expansão as células do cumulus (CC), fragmentação de DNA em CC e oócito, maturação nuclear oocitária, metabolismo energético e produção de progesterona. Os COC foram maturados em meios de tratamento (controle, FGF16, BMP15 e FGF16+BMP15) e avaliados em diferentes momentos da MIV (0 e 22 horas). A análise da expansão das CC demonstrou efeito positivo ($p=0,0071$) da BMP15 ($11,34\pm 1,09$ unidade arbitrária/UA) e da combinação FGF16+BMP15 ($11,34\pm 0,61$ UA) em relação ao grupo controle ($8,73\pm 0,44$ UA) e ao suplementado com FGF16 ($9,42\pm 0,65$ UA). A presença de fragmentação de DNA em CC ($p=0,0015$) e oócitos ($p=0,036$) foi significativamente menor em COC tratados com BMP15 ($11,73\pm 1,24$ % e $3,81\pm 2,76$ %, respectivamente) em comparação ao grupo FGF16 ($22,54\pm 2,80$ % e $31,13\pm 7,81$ %, respectivamente). Ainda, o FGF16 causou aumento na incidência de fragmentação de DNA em CC, quando relacionado ao controle ($16,04\pm 1,45$ %). A taxa de maturação nuclear oocitária foi superior ($p=0,014$) no grupo suplementado com BMP15 ($93,60\pm 4,03$ %) em comparação aos grupos controle ($80,80\pm 2,49$ %) e FGF16 ($76,75\pm 2,28$ %), aproximando-se da totalidade. De forma inédita, descrevemos ação da BMP15 ($10,79\pm 0,72$ ng/ml) no incremento da produção de progesterona, sendo maior ($p=0,0113$) do que a produzida nos grupos controle ($8,38\pm 0,39$ ng/ml) e FGF16 ($8,84\pm 0,45$ ng/ml). Não foi evidenciado efeito dos tratamentos sobre o consumo de glicose e a produção de lactato. O presente estudo

reforça o envolvimento da BMP15 na foliculogênese e na diferenciação do COC. Deste modo, a adição da BMP15 (100ng/ml) aos convencionais protocolos de PIVE pode ser de grande valia para elevar a efetividade desta biotecnologia. A suplementação de FGF16 (10ng/ml) se mostrou indiferente ao processo de maturação, permitindo inferir que o FGF16 não tenha envolvimento nas etapas da maturação compreendidas pelo presente estudo *in vitro*. Não foi observada ação sinérgica entre o FGF16 e a BMP15.

Palavras-chave: Maturação oocitária. Bovinos. Fatores de crescimento. FGF16. BMP15.

ABSTRACT

DELGADO, J. C. **The influence of fibroblast growth factor 16 (FGF16) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) in the acquisition of oocyte competence in cattle.** [Influência do fator de crescimento fibroblástico 16 (FGF16) e da proteína morfogênica óssea 15 (BMP15) na aquisição da competência oocitária em bovinos]. 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

In vitro embryo production (IVEP) efficiency is reduced when compared to *in vivo*. Gaining knowledge of bovine oocyte maturation mechanisms will provide bases to improve *in vitro* systems. The present study assessed the *in vitro* effects of fibroblast growth factor 16 (FGF16), bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and their interaction on relevant parameters to cumulus oocyte complex (COC) development, such as: cumulus cells (CC) expansion, oocyte and CC DNA fragmentation, nuclear maturation, energetic metabolism and progesterone production. COCs were matured in control or supplemented media containing, FGF16 (10ng/ml), BMP15 (100ng/ml), FGF16+BMP15 and analyzed at different times of IVM (0 and 22 hours). CC expansion evaluation demonstrated a positive effect ($p=0.0071$) of BMP15 (11.34 ± 1.09 arbitrary unit/AU) and FGF16+BMP15 (11.34 ± 0.61 AU) when compared to control (8.73 ± 0.44 AU) and FGF16 groups (9.42 ± 0.65 UA). The presence of DNA fragmentation in CC ($p=0.0015$) and oocytes ($p=0.036$) were lower in COCs treated in media supplemented with BMP15 (11.73 ± 1.24 % and 3.81 ± 2.76 %, respectively) in comparison to FGF16 group (22.54 ± 2.80 % and 31.13 ± 7.81 %, respectively). Moreover, FGF16 caused an increase in CC DNA fragmentation, when related to control (16.04 ± 1.45 %). Oocyte nuclear maturation rate was higher ($p=0.014$) in groups supplemented with BMP15 (93.60 ± 4.03 %) compared to control (80.80 ± 2.49 %) and FGF16 treatments (76.75 ± 2.28 %), almost reaching the totality of COCs. In an unprecedented way, we described the BMP15 increasing action on progesterone production (10.79 ± 0.72 ng/ml; $p=0.0113$) when compared to control (8.38 ± 0.39 ng/ml) and FGF16 groups (8.84 ± 0.45 ng/ml). There were no differences in glucose consumption and lactate production. The present study reinforces BMP15 involvement in folliculogenesis and COC differentiation. FGF16 (10 ng/ml) media supplementation did not improve any of the outcomes measured, suggesting that

FGF16 is not involved in the maturation steps analyzed in the present *in vitro* study. Thus, the inclusion of BMP15 (100 ng/ml) to conventional IVEP protocols can be valuable to increase the effectiveness of this biotechnology. Synergistic action between FGF16 and BMP15 was not observed.

Keywords: Oocyte maturation. Bovine. Growth factors. FGF16. BMP15.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	A CASCATA.....	19
2.2	METABOLISMO DO COC DURANTE O PROCESSO DE MATURAÇÃO.....	21
2.2.1	Expansão das células do cumulus.....	22
2.2.2	Maturação nuclear oocitária.....	24
2.2.3	Fragmentação de DNA.....	24
2.2.4	Metabolismo energético.....	26
2.2.5	Produção de progesterona.....	30
2.3	REGULADORES INTRAOVARIANOS.....	31
2.3.1	Proteína morfogênica óssea 15.....	33
2.3.2	Fator de crescimento fibroblástico 16.....	35
3	HIPÓTESES.....	37
4	OBJETIVOS.....	39
4.1	OBJETIVO GERAL.....	40
4.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	40
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	41
6	MATERIAL E MÉTODO.....	43
6.1	OBTENÇÃO DOS COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITO.....	44
6.2	MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	44
6.3	ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS.....	45
6.3.1	Oócitos e células do cumulus para análise da	

	fragmentação de DNA e maturação nuclear oocitária.....	45
6.3.2	Meio de maturação após a MIV para mensuração de metabólitos energéticos (glicose e lactato) e progesterona.....	46
6.4	EXPANSÃO DAS CÉLULAS DO CUMULUS.....	47
6.5	FRAGMENTAÇÃO DE DNA EM OÓCITOS E MATURAÇÃO NUCLEAR OOCITÁRIA.....	49
6.6	FRAGMENTAÇÃO DE DNA EM CÉLULAS DO CUMULUS.....	51
6.7	PRODUÇÃO DE PROGESTERONA.....	52
6.8	CONSUMO DE GLICOSE E PRODUÇÃO DE LACTATO.....	53
6.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
7	RESULTADOS.....	55
7.1	EXPANSÃO DAS CÉLULAS DO CUMULUS.....	56
7.2	FRAGMENTAÇÃO DE DNA EM OÓCITO.....	57
7.3	FRAGMENTAÇÃO DE DNA EM CÉLULAS DO CUMULUS.....	60
7.4	MATURAÇÃO NUCLEAR OOCITÁRIA.....	62
7.5	PRODUÇÃO DE PROGESTERONA.....	64
7.6	CONSUMO DE GLICOSE E PRODUÇÃO DE LACTATO.....	65
7.7	CORRELAÇÃO DAS VARIÁVEIS DEPENDENTES.....	67
8	DISCUSSÃO.....	69
9	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS.....	77
	ANEXOS.....	90
	APÊNDICES.....	93

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Fêmeas bovinas, assim como nas demais espécies, nascem com um número determinado e limitado de gametas nos ovários. Tal restrição ocorre ainda na vida fetal, não sendo possível a síntese posterior. Dentre os folículos da reserva ovariana, apenas uma pequena parcela é capaz de atingir a ovulação, sendo majoritária a quantidade de oócitos que entram no processo de atresia. A manutenção da dormência, a ativação do folículo primordial, assim como todas as demais atividades envolvidas na aquisição da capacidade de desenvolvimento oocitário são controladas por fatores autócrinos e parácrinos, sintetizados por células somáticas e germinativas (como os FGF e as BMP), e fatores endócrinos, como as gonadotrofinas.

Com a finalidade de otimizar o uso de gametas provenientes de fêmeas de alto valor genético, têm-se utilizado biotécnicas da reprodução, como a superovulação seguida de transferência de embrião e a produção *in vitro* de embriões a partir de oócitos obtidos por aspiração folicular (CAIXETA, 2012).

Apesar dos constantes estudos, sabe-se que a eficiência da PIVE é inferior à observada *in vivo*. Uma das razões para tal diferença está no não-fornecimento de um meio (artificial) de composição semelhante ao fisiológico materno. Esta carência compromete o avanço no desenvolvimento oocitário e embrionário, reduzindo a efetividade da técnica.

Sugere-se que, com a retirada dos oócitos dos folículos, haja a perda da influência de diversos fatores constituintes do fluido folicular. A consequência desta privação é o início do fenômeno de maturação nuclear e citoplasmática não-fisiológico, o qual pode prejudicar a capacitação do oócito (DODE et al., 2006). Portanto, o avanço da análise das reações envolvidas na maturação permite elevar a eficácia da PIVE tanto em quantidade de estruturas como em qualidade das mesmas.

O aprimoramento na produção de embriões *in vitro* ou *in vivo* culmina em uma maior otimização reprodutiva do rebanho nacional, permitindo elevar a demanda de alimentos e reduzir a interferência ao meio ambiente. Ainda, o incremento nas técnicas de reprodução assistida em bovinos pode posteriormente servir como

modelo no estabelecimento de melhores protocolos na reprodução humana, na qual a obtenção de material biológico para estudos científicos é restrita.

O presente estudo intencionou avaliar as influências de dois fatores de crescimento (separadamente e em concomitância), o FGF16 e a BMP15, os quais têm ampla participação em diversos processos biológicos. Apesar de a literatura descrever o FGF16 em diferentes tecidos e etapas do desenvolvimento, até o atual momento, há poucos estudos correlacionando-o ao âmbito reprodutivo, em especial, à maturação oocitária bovina. De modo oposto, a BMP15 tem sido largamente pesquisada, uma vez que sua ação está envolvida em todas as fases da produção do gameta feminino e na modulação da aquisição da capacidade de desenvolvimento oocitária.

O delineamento experimental assumido neste trabalho permitiu evidenciar as variadas formas de contribuição do FGF16 e da BMP15 (em combinação ou de forma isolada) sobre relevantes parâmetros da diferenciação do COC bovino durante o processo de maturação *in vitro* (MIV): expansão das células do cumulus, fragmentação de DNA em oócitos e CC, maturação nuclear oocitária, produção de progesterona e metabolismo energético.

A completa compreensão do comportamento dos fatores intraovarianos e endócrinos, fornecerá embasamento para melhorias da técnica de PIVE, permitindo o avanço desta tecnologia e a obtenção da excelência.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A maturação oocitária é de suma importância à produção de embriões (*in vivo* ou *in vitro*) por ser responsável pela quebra da vesícula germinativa (com consequente retomada da meiose), pelo estabelecimento da cumplicidade entre as células do COC (influência bidirecional) e pela construção de um microambiente folicular ideal para o correto desenvolvimento do COC e do embrião inicial. A capacidade intrínseca do oócito de (1) retomar e realizar a meiose, (2) suportar a fecundação, (3) permitir o desenvolvimento do embrião pré-implantação e, posterior, desenvolvimento fetal até o termo e (4) gerar um produto final saudável recebe o nome de “capacidade de desenvolvimento oocitária” (SIRARD et al., 2006; GILCHRIST, 2011). Para atingir este status, o COC deve passar por uma série de fenômenos bioquímicos e correlatos envolvendo as células germinativas e somáticas, como a maturação oocitária nuclear e citoplasmática. A primeira se refere à progressão da meiose pela cromatina, culminando na saída da fase de vesícula germinativa até atingir a etapa de metáfase II. A segunda inclui todas as alterações internas do oócito, como acúmulo de mRNA e proteína, reorganização do citoesqueleto e das organelas e alterações no metabolismo celular (HERRICK et al., 2006).

2.1 A CASCATA

In vivo, o pico de LH desencadeia a maturação do COC por intermédio das células da granulosa mural (CG), uma vez que o receptor para o LH não é expresso em níveis fisiologicamente relevantes nas CC e no oócito (PENG et al., 1991; RICHARDS et al., 2002). O LH se liga a receptores acoplados à proteína G específicos, ativando a enzima adenilato ciclase hormônio-sensível (conversora de ATP em cAMP). O cAMP atua como segundo mensageiro, participando dos mecanismos de controle e retomada da meiose, esteroidogênese, expansão do cumulus e metabolismo energético. O aumento da concentração intraoocitária de

cAMP faz com que o oócito se mantenha em bloqueio meiótico (permanecendo em prófase I), uma vez que suprime o fator promotor de maturação (MPF). O oócito contém mecanismos capazes de controlar tal concentração por meio da síntese da fosfodiesterase do tipo 3 (PDE3), a qual degrada o cAMP (TSAFRIRI et al., 1996). O estímulo gonadotrófico ovulatório resulta no decréscimo das concentrações de cGMP no oócito e no folículo, causando um aumento da atividade da PDE3, com consequente incremento da degradação de cAMP, levando a redução da supressão da MPF e à retomada da meiose (NORRIS et al., 2009; VACCARI et al., 2009).

De forma contemporânea, o LH pré-ovulatório induz a expressão da ampiregulina (AREG), epiregulina (EREG) e betacelulina (BTC), fatores de crescimento pertencentes à família dos EGF (fatores EGF-*like*), sintetizados pelas células da granulosa mural (PARK et al., 2004). Esses peptídeos atuam de forma autócrina sobre as CG e como fatores parácrinos nas CC, via ativação dos receptores de EGF (EGFR). Hsieh et al. (2007) sugerem que os EGFR sejam os principais componentes da propagação do sinal pré-ovulatório de LH das CG, resultando em ativação de vias nas CC, que permitem a transmissão do estímulo até a célula oocitária. A chegada do sinal ao oócito faz com que este inicie o processo de maturação nuclear e citoplasmática e intensifique a comunicação bidirecional com o intuito de suprimir as necessidades e modular as funções entre as células germinativas e somáticas, buscando a correta aquisição de capacidade de desenvolvimento (Figura 1; ASHKENAZI et al., 2005; CONTI et al., 2006; GILCHRIST, 2011; MACHADO, 2012).

A maturação de oócitos *in vitro* ocorre na presença de FSH, mas não de LH, devido à presença de receptores para FSH, mas não para LH, em células do cumulus de folículos de pequeno a médio tamanho, os quais são utilizados na produção *in vitro* de embriões (VAN TOL et al., 1996).

Acredita-se que a cascata metabólica relacionada à maturação oocitária *in vitro* ocorra de forma similar à observada *in vivo* (Figura 1). Porém, a literatura relata inúmeras limitações na técnica de MIV, que impedem a compatível eficiência encontrada no processo *in vivo*. Uma das mais aceitas razões desta parcial inabilidade é a falta de completo conhecimento da cadeia de maturação do oócito, assim como da composição correta do fluido folicular. Tais descobertas permitiriam oferecer, em laboratório, um ambiente o mais próximo do fisiológico, elevando a eficiência desta essencial tecnologia.

Figura 1 - Imagem esquemática da comunicação multilateral entre os componentes do COC durante o processo de maturação oocitária

Fonte: (GILCHRIST, 2011).

Legenda: “LH”= hormônio luteinizante; “LHR”= receptor de hormônio luteinizante; “cAMP”= adenosina monofosfato cíclico “p38”; “AREG”= ampiregulina; “EREG”= epiregulina; “BTC”= betacelulina; “ANP”= peptídeo natriurético atrial; “GC”= grânulo cortical; “Cx43”= conexina 43; “ERK1/2”= quinase reguladora do sinal extracelular 1/2; “EGFR”= receptor do fator de crescimento epidermal; “PGE2”= prostaglandina E2; “PTGER2”= receptor de prostaglandina do tipo 2; “FSH”= hormônio folículo estimulante; “FSHR”= receptor de hormônio folículo estimulante; “SMAD2/3”= transdutor de sinal intracelular relacionado à Sma- e Mad- 2/3; “HAS2”= hialurona sintase 2; “TSG6”= proteína indutora do fator de necrose tumoral 6; “PTX3”= pentraxina 3; “cGMP”= guanosina monofosfato cíclico; “BMP15”= proteína morfogênica óssea 15; “GDF9”= fator de crescimento e diferenciação 9; “BMPRII”= receptor da proteína morfogênica óssea do tipo II; “ALK5/6”= activin receptor-like kinases; “PDE3”= fosfodiesterase do tipo 3; “PKA”= proteína quinase A; “MPF”= fator promotor da maturação; “GVBD”= quebra da vesícula germinativa.

2.2 METABOLISMO DO COC DURANTE O PROCESSO DE MATURAÇÃO

A regulação do metabolismo das células do cumulus e do oócito é fundamental para a eficiência no processo maturação do COC. Os componentes e as concentrações de substratos adicionados ao meio de MIV alteram o perfil

metabólico das células somáticas e o processo de maturação do oócito. O melhor conhecimento sobre as atividades metabólicas ocorridas do COC, permite otimizar as condições de maturação *in vitro* às quais estas estruturas são submetidas (SUTTON et al., 2003).

2.2.1 Expansão das células do cumulus

O processo de expansão das CC envolve a secreção de uma matriz rica em ácido hialurônico (AH) pelas CC e a expressão de uma variedade de proteínas necessárias para a correta composição e estabilização da matriz. Tal expansão se dá após a indução gonadotrófica pré-ovulatória de LH *in vivo* ou pela suplementação de FSH ao meio de maturação em manipulações *in vitro*. Estes estímulos desencadeiam cascatas bioquímicas intracelulares que culminam na expressão de genes e produção proteica (Figura 1). Dentre os principais genes envolvidos na expansão estão: hialurona sintase 2 (HAS 2), prostaglandina sintase 2 (PTGS2, também denominada COX2), proteína indutora do fator de necrose tumoral 6 (TSG6) e pentraxina 3 (PTX3). Muitos pesquisadores têm focado esforços para a completa compreensão dos fenômenos que ocorrem nas vias de expansão das CC e dos componentes envolvidos nelas (PARK et al., 2004; MACHADO, 2008; CAIXETA, 2012). No entanto, lacunas no conhecimento ainda existem, sendo necessários mais estudos para a elucidação destes pontos.

A morfologia do revestimento de células do cumulus ao redor do oócito imaturo é largamente empregada como um dos critérios iniciais de seleção dos COC destinados ao processo de MIV. Há relatos, nos quais, o grau de expansão destas células representa um indicador morfológico e não invasivo de qualidade oocitária. Chen et al. (1993), em estudo com murinos, correlacionaram o sucesso na fecundação (determinada pelo desenvolvimento embrionário até o estágio de 2 células) com a quantidade e qualidade da massa de células do cumulus expandida. Porém, a conexão entre expansão das CC e aquisição da capacidade de desenvolvimento do oócito é um conceito refutado por alguns pesquisadores (ALI; SIRARD, 2002; LUCIANO, et al., 2004).

O ácido hialurônico é o principal componente da matriz extracelular necessária para a expansão das células do cumulus. A síntese de AH ocorre pela metabolização da glicose por meio da via de biossíntese de hexosamina (discutida melhor no tópico “metabolismo energético”) pelas células da granulosa e, principalmente, pelas células do cumulus. A indução de produção se dá após o estímulo pré-ovulatório do LH. A literatura associa o AH com diversas funções biológicas como: estímulo da proliferação, agregação e adesão celular (KANEKO et al., 2000), manutenção da hidratação, lubrificação de articulações, angiogênese (SLEVIN et al., 2007), migração celular, (TURLEY, 1992; MUTO et al., 2014), carcinogênese (TOOLE, 2004), regulação do sistema imune (YANG et al., 2002; TERMEER et al., 2003; JACKSON, 2009) e envelhecimento¹. No contexto reprodutivo, trabalhos sugerem que AH esteja envolvido na prevenção da segmentação de oócitos murinos *in vitro* (SATO et al., 1987), na inibição da apoptose em CC e CG em bovinos (KANEKO et al., 2000), na manutenção da qualidade embrionária bovina (SAITO et al., 1994), no processo de capacitação espermática, influxo de cálcio e reação acrossomal (SLOTTE et al., 1993; GUTNISKY et al., 2007; YAGCI et al., 2010) e na inibição da ativação de caspase em células da granulosa mural suína (TUNJUNG et al., 2009). Ainda, Miyano et al. (1994), descobriram que o AH reduz a frequência de oócitos degenerados em suínos.

Preferencialmente, a ação do AH ocorre por meio do acoplamento com o receptor CD44, presente na superfície e, em alguns casos, no citoplasma de diversos tipos celulares, como em células do cumulus, células da granulosa, oócitos e embriões bovinos em início de desenvolvimento (FURNUS et al., 2003). O nível de expressão de CD44 é maior em CC quando comparado ao das CG, assim como COC maturados apresentam expressão superior à dos imaturos em humanos (OHTA et al., 1999). Kaneko et al. (2000) observaram que o emprego de anticorpo anti-CD44 inibe o efeito do AH em prevenir a apoptose em CG humana de modo dose dependente.

Os dados demonstrados sugerem que a expansão das CC, em decorrência da presença, dentre outros compostos, de AH e CD44, de fato, contribua à aquisição da capacidade de desenvolvimento oocitária, manutenção fetal e capacitação espermática, sendo um importante parâmetro de estudo.

¹ ROBERT, L. Hyaluronan, a truly “youthful” polysaccharide. Its medical applications. **Pathologie Biologie** (Paris), 2014. Article in press.

2.2.2 Maturação nuclear oocitária

Previamente ao estímulo gonadotrófico pré-ovulatório, os oócitos de mamíferos se mantêm bloqueados no estágio de diplótene da prófase I até a maturidade reprodutiva. A ação do LH *in vivo* desencadeia a resolução da meiose, resultando na quebra da vesícula germinativa e evoluindo até a extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP) com novo bloqueio em metáfase II. O processo de meiose será completamente realizado após a fecundação do oócito e a extrusão do segundo CP (HYTTEL et al., 1989).

O controle da inibição da maturação nuclear ocorre por influência de fatores produzidos pelas células somáticas do folículo. Tal modulação é essencial para que as maturações citoplasmática e nuclear se concluam de modo sincronizado antes da ovulação (SUTTON-MCDOWALL et al., 2010; CONTI et al., 2012; HENNET et al., 2012). Porém, a remoção do oócito do folículo antral induz a resolução imediata da maturação nuclear, tornando o processo de produção *in vitro* de embriões ineficiente. Os protocolos convencionais de MIV visam a prevenção do adiantamento da maturação nuclear, permitindo o coordenado mecanismo de maturação em laboratório.

A maturação nuclear representa uma variável essencial para a aquisição de desenvolvimento oocitário, pois é neste processo que o material genético do gameta feminino é reformulado morfológica (compactação do DNA) e numericamente (cópias dos cromossomos), além de sofrer alteração na disposição celular (separação do prónucleo feminino [PNF] e extrusão do CP). O sucesso dessas etapas aproxima o oócito da configuração ideal para a fecundação, sendo essencial ao processo de PIVE.

2.2.3 Fragmentação de DNA

O sistema reprodutor feminino, desde o período fetal, desempenha um papel de controle celular, seja em sua quantidade ou qualidade. Tal atividade se dá a partir

de um estresse, estímulo externo ou qualquer incongruência na população celular, culminando no processo de morte celular programada, ou apoptose.

A maioria das células germinativas (cerca de dois terços) produzidas ao longo da oogênese são perdidas durante o desenvolvimento fetal ovariano em humanos e diversas outras espécies de vertebrados (BEAUMONT; MANDL, 1961; MORITA; TILLY, 1999). A correta explicação para esta alta produção celular e posterior considerável perda numérica não foi obtida até o momento (TILLY, 2001). Na puberdade, as células germinativas remanescentes passam por novos processos de triagem, nos quais, em cada ciclo reprodutivo, há o recrutamento de uma parcela destas e a divergência folicular, com a separação do(s) folículo(s) dominante(s) e a atresia dos demais subordinados. Acredita-se que em ambos os processos de seleção haja um importante papel das cascatas bioquímicas intracelulares referentes à morte celular programada (JOLLY et al., 1994; IRVING-RODGERS et al., 2001; TILLY, 2001). Segundo Tilly (2001), a apoptose é responsável pela perda de mais de 99,9% das células de linhagem germinativa feminina, podendo, eventualmente, causar infertilidade irreversível ou falha da atividade ovariana.

A literatura sugere que qualquer fator que afete as CC, como a apoptose, deve refletir na redução da qualidade oocitária e, como consequência, o desenvolvimento embrionário será prejudicado. Isso porque as CC apresentam importante função no processo de maturação oocitária e na proteção do oócito contra diversos agentes, como as espécies reativas de oxigênio (LEE et al., 2001; CORN et al., 2005; YUAN et al., 2005; ANGUITA et al., 2009). Ainda, a apoptose em CC pode refletir um estado de sofrimento celular e fazer parte do contexto da regressão folicular. Portanto, a morte celular programada pode ser considerada como um marcador preditivo de comprometimento da qualidade do oócito e do desenvolvimento do futuro conceito.

Em tecidos normais, a morte celular programada faz parte do convencional processo de renovação celular. Além disso, a apoptose está muito relacionada à biologia de diversas doenças, como doenças degenerativas e autoimunes, danos por isquemia e câncer (KERR et al., 1972; ELMORE, 2007). A homeostasia do sistema é o resultado do ideal balanço da proliferação e morte celular e, portanto, do equilíbrio entre fatores pró- e anti-apoptóticos (TILLY, 2001; MÉNÉZO et al., 2010).

As células destinadas à apoptose apresentam um perfil de expressão gênica que determina a própria eliminação, deslocando o equilíbrio para o sentido pró-

apoptótico. Alterações morfológicas bem caracterizadas permitem a identificação histológica do processo, sendo as principais: encolhimento celular, empacotamento das organelas, condensação da cromatina (picnose) e marginalização da mesma na membrana nuclear, cariorrexis e formação de corpos apoptóticos (KERR et al., 1972; ELMORE, 2007; BERGHE et al., 2013). Em geral, a morte celular programada acomete uma célula individualmente ou um cluster celular, além de não ocorrer processo inflamatório ao redor, ao contrário do observado no processo de necrose. A cascata da apoptose pode seguir duas vias, a extrínseca (ou via receptores “da morte”) e a intrínseca (ou via mitocondrial). Independentemente do tipo celular, do estímulo aplicado e da via assumida, o término da via da morte celular programada é constante: ativação de caspases executoras, com subsequente ativação de endonucleases endógenas, as quais resultarão na clivagem do DNA em múltiplos fragmentos, culminando na perda da função gênica e morte celular (ELMORE, 2007). Portanto, a fragmentação de DNA no COC representa uma característica fundamental ao processo de aquisição da qualidade de desenvolvimento oocitário, sendo esta a variável escolhida para análise.

Nota: Muitos autores utilizam a nomenclatura “apoptose” como sinônimo de “fragmentação de DNA”. De fato, ao longo da morte celular programada haverá a fragmentação do material genético, porém nem toda fragmentação de DNA culmina em apoptose celular. Isso porque, há um limiar de tolerância à fragmentação (inerente de cada tipo de célula), sendo deletério apenas quando este limite é ultrapassado. Foi padronizado, para este estudo, o emprego das nomenclaturas separadas.

2.2.4 Metabolismo energético

O correto desenvolvimento do processo de maturação oocitária é obrigatoriamente dependente do fornecimento de glicose e de seus subprodutos. O aproveitamento destes substratos energéticos ocorre por meio de 4 grandes vias metabólicas (glicolítica, fosfato-pentose, biossíntese de hexosamina e poliol), as

quais atuarão em diferentes funções celulares (somáticas ou germinativas) necessárias à aquisição da capacidade de desenvolvimento do oócito (Figuras 2 e 3, SUTTON-MCDOWALL et al., 2010).

Figura 2 - Representação das quatro vias de metabolização da glicose e seus destinos dentro dos compartimentos celulares componentes do COC

Fonte: (SUTTON-MCDOWALL et al., 2010).

Legenda: "ATP"= adenosina trifosfato; "ROS"= espécies reativas de oxigênio; "TCA cycle"= ciclo do ácido tricarboxílico; "NADPH"= ; "GSSG"= glutatona oxidada; "GSH"= glutatona reduzida; "PPP"= via fosfato-pentose; "PRPP"= fosforibosilpirofosfato; "HBP"= via de biossíntese de hexosamina; "ECM"= matriz extracelular; "GV"= vesícula germinativa; "MI"= metáfase I; "MII"= metáfase II.

Figura 3 – Imagem esquemática das cascatas dos processos bioquímicos relacionadas às 4 vias metabólicas de utilização da glicose pelo COC

Fonte: (SUTTON-MCDOWALL et al., 2010).

Legenda: “AR”= aldose redutase; “ECM”= matriz extracelular; “G6PDH”= glicose-6-fosfato desidrogenase; “GFPT”= glicosamina:frutose-6-fosfato acetil transferase; “HAS-2”= hialurona sintetase 2; “HK”= hexoquinase; “OGT”= glicosilação O-linked; “PFK”= fosfofrutoquinase; “SDH”= sorbitol desidrogenase.

A via glicolítica (Figura 3, em azul) é a que detém a maior proporção do metabolismo da glicose no COC, tendo importante papel no normal funcionamento oocitário. É responsável pela produção de energia na forma de ATP e de metabólitos que podem ser prontamente utilizados pelo oócito, como o lactato e o piruvato (DOWNS; UTECHT, 1999; HARRIS et al., 2007, 2009). A alta capacidade das CC em metabolizar glicose é caracterizada pela presença de receptores SLC2A1 e SLC2A4, assim como da atividade de enzimas glicolíticas, fatores pouco existentes no oócito. Este utiliza predominantemente os produtos da lise da glicose para a metabolização, via ciclo do ácido tricarboxílico, seguida pela fosforilação oxidativa, obtendo, ao final da cascata, ATP (SUTTON-MCDOWALL et al., 2010).

A via fosfato-pentose (Figura 3, em verde) metaboliza a glicose para fornecer produtos envolvidos na maturação nuclear e citoplasmática oocitária. Isso porque um dos metabólitos sintetizados é o NADPH, necessário para a integridade citoplasmática e o controle do estado redox, por meio da redução da glutathione (molécula antioxidante). Um outro produto importante desta via é o fosforibosilpirofosfato, o qual é substrato para a síntese de purina, e, consequentemente, para o controle da maturação nuclear. O fluxo de glicose via fosfato-pentose permite a progressão de estágios meióticos, como: a retomada da meiose, a transição de MI para MII e a retomada da meiose pós-fecundação (DOWNS et al., 1998; SUTTON-MCDOWALL et al., 2005; HERRICK et al., 2006).

A via de biossíntese de hexosamina (Figura 3, em vermelho) é responsável por metabolizar a glicose, fornecendo ao COC substratos necessários para a formação da matriz extracelular e expansão das células do cumulus, como a glucosamina. Esta é, conjuntamente à glicose, precursora da síntese de ácido hialurônico, o principal componente da matriz extracelular (SUTTON-MCDOWALL et al., 2004, 2010). Ainda, os produtos desta via atuam em um importante mecanismo regulatório de proteínas citosólicas e nucleares, caracterizado pela glicosilação “*O-linked*”. Tal processo de regulação da função proteica é essencial em diversos processos celulares, como: regulação do ciclo celular, modulação das vias de dano/reparo celular e transcrição e tradução de proteínas (HALTIWANGER et al., 1997; VAN DEN STEEN et al., 1998; COMER; HART, 2000; SLAWSON et al., 2003; FRANK et al., 2014).

A via polioli (Figura 3, em roxo) está envolvida na oxidação da glicose, dando origem ao sorbitol e à frutose. As funções e implicações desta via, assim como de seus metabólitos, sobre a maturação oocitária ainda são pouco conhecidas (SUTTON-MCDOWALL et al., 2010).

A glicose é, de fato, um metabólito de suma importância ao longo de todo o processo de maturação oocitária, representando uma das peças-chave da aquisição da capacidade de desenvolvimento do oócito. O maior conhecimento do metabolismo energético do COC, assim como a compreensão das vias de emprego da glicose, permitirá o incremento da eficiência das técnicas de reprodução assistida e a otimização do emprego de material biológico.

2.2.5 Produção de progesterona

A progesterona é um hormônio esteroide sintetizado pelas CG, CC e células luteais do ovário. A quantidade secretada deste hormônio depende do nível de estimulação gonadotrófico e do estado fisiológico do ovário. Os principais focos de atuação da progesterona são o eixo hipotálamo-hipófise-gônada (que regula a secreção de gonadotrofinas), a glândula mamária (estimulando desenvolvimento) e o útero (para estruturar o ambiente uterino, tornando-o viável para manutenção da prenhez; PELUSO, 2006). Acredita-se que a progesterona, juntamente com a prostaglandina E2, seja necessária para o sucesso na diferenciação terminal do COC, representando um importante mediador da expansão das CC, da retomada da meiose e, portanto, da capacidade de desenvolvimento oocitário (SHIMADA; TERADA, 2002; SHIMADA et al., 2004; WANG et al., 2006). Em estudo de Aparicio et al. (2011), não foi possível encontrar tal correlação, possivelmente em decorrência de divergências no protocolo de maturação. Nuttinck et al. (2008), demonstraram que, ao longo da maturação oocitária bovina *in vitro*, há aumento dos níveis de progesterona no meio de MIV, sugerindo sua importância no processo. O'Shea et al. (2013) comprovaram o efeito anti-apoptótico da progesterona sobre o COC durante o processo de maturação oocitária bovina. Este mesmo grupo identificou o gene AVEN como um biomarcador da qualidade do oócito, cuja regulação se dá pela progesterona, podendo ser determinado por análises moleculares das CC. Ainda, a progesterona atua na indução da reação acrossomal de espermatozoides capacitados (THÉRIEN et al., 2003; BALDI et al., 2011; LISHKO et al., 2011; PUBLICOVER et al., 2011; STRÜNKER et al., 2011; GADELLA, 2012; BUFFONE et al., 2014). A literatura apresenta diversos outros trabalhos que correlacionam a atividade da progesterona com a fisiologia de diferentes sistemas do organismo. Por exemplo, Vicent et al. (2006) demonstraram, em estudo com murinos, que a progesterona participa do processo de indução de genes específicos pela modificação da cromatina, preparando-a para a transcrição.

A ação da progesterona é mediada pela interação do hormônio a receptores específicos presentes em órgãos reprodutivos femininos. Há três categorias de receptores descritos para a progesterona: os genômicos (nPR-A e nPR-B), os quais atuam como fatores de transcrição, modulando cascatas de genes que regulam

diversas ações biológicas deste hormônio (O'MALLEY, 2005); os não-genômicos (mPR α , mPR β e mPR γ) de rápida ativação da sinalização intracelular, sendo independente da regulação transcricional ou genômica; e os componentes dos receptores de membrana de progesterona não-genômicos (PGMRC1 e PGMRC2), supostamente envolvidos na regulação da ação anti-apoptótica da progesterona sobre as células da granulosa e luteais (PELUSO, 2006). Aparicio et al. (2011) demonstraram a incidência desses tipos de receptores nas células componentes do COC bovino. Tal presença se mostrava alterada conforme o tipo celular e o status de maturação, sugerindo um importante papel da progesterona no processo de maturação oocitária, uma vez que a ativação dos diferentes receptores dará início às suas respectivas cascatas bioquímicas.

Portanto, um único hormônio pode atuar de formas divergentes, resultando em uma gama de respostas intracelulares necessárias ao correto controle da maturação oocitária e ao sucesso no desenvolvimento embrionário posterior. Tendo em vista tal relevância, o estudo das influências do ambiente folicular *in vivo* e do cultivo *in vitro* sobre o comportamento e a ação da progesterona mostram-se de grande valia para a compreensão dos processos bioquímicos envolvidos, assim como para a descoberta de melhorias que elevem a eficiência do processo de MIV.

2.3 REGULADORES INTRAOVARIANOS

O oócito participa ativamente de mecanismos reguladores da maturação e do desenvolvimento do COC, via secreção de fatores parácrinos solúveis (também chamados de “fatores secretados pelo oócito” ou OSF) – destacando-se os membros da família do fator de crescimento transformante β (TGF β), como a proteína morfogênica óssea 15 (BMP15) e o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9; GILCHRIST et al., 2008; GILCHRIST, 2011). Os OSF agem em cooperação com hormônios e outros fatores parácrinos locais para controlar a diferenciação das células somáticas adjacentes e, indiretamente, do próprio oócito (foliculogênese e oogênese), além de serem responsáveis pela manutenção do correto fenótipo folicular (EPPIG, 2001; MCNATTY et al., 2004; GILCHRIST et al., 2008; GILCHRIST, 2011). O controle, portanto, é representado por um processo fino de

interações entre o sistema endócrino (principalmente gonadotrofinas) e os componentes moleculares produzidos localmente pelas células germinativas e somáticas integrantes do COC. Hussein et al. (2006) afirmaram que os OSF influenciam diretamente no desenvolvimento da competência durante a maturação *in vitro*. Evidenciaram, ainda, que estes fatores (particularmente, BMP15 e GDF9) regulam o microambiente do COC, sendo um importante determinante da programação do oócito. Segundo McNatty et al. (2004), a expressão aberrante de qualquer dos participantes da via do BMP15 e GDF9 (ligantes, receptores e segundos mensageiros) resulta em esterilidade e aumento de doenças relacionadas à fecundidade e acometimentos ovarianos de modo espécie-específico.

Os fatores secretados pelas células da granulosa, da teca e do cumulus e, em especial, pelo oócito têm sido amplamente estudados, uma vez que influenciam o metabolismo do COC como um todo. Há trabalhos que afirmam o envolvimento destes componentes na expressão de genes e na produção de proteínas essenciais para: (1) o estímulo do crescimento e prevenção da morte celular, (2) a regulação do metabolismo energético, (3) a biossíntese de esteroides, (4) a regulação da expansão das células do cumulus, (5) a retomada da maturação e o controle do metabolismo, (6) a proliferação celular, (7) a modulação da síntese de inibina e de receptores de LH, (8) a competência do oócito e (9) o desenvolvimento embrionário (BUCCIONE et al., 1990; SALUSTRI et al., 1990; VANDERHYDEN et al., 1993; EPPIG et al., 1997; LI et al., 2000; SUTTON et al., 2003; GILCHRIST et al., 2004; HUSSEIN et al., 2005; SUGIURA et al., 2005; SU et al., 2008; GILCHRIST et al., 2008). Hussein et al. (2005) comprovaram a teoria proposta por Eppig (2001), a qual afirmava que o oócito previne ativamente a apoptose das CC por estabelecer sobre elas um gradiente morfogênico de OSF. Gilchrist (2011) sugere que os OSF sejam “mensageiros” do oócito que atuam diretamente sobre as CC, de modo a estimular ações, as quais o oócito apresenta baixa capacidade para realizar, como, por exemplo, a glicólise (SUTTON-MCDOWALL et al., 2010).

Tal comunicação entre os componentes do COC se dá por meio de vias de sinalização parácrinas intrafoliculares e por processos citoplasmáticos trans-zonais, nos quais as junções do tipo *gap* permitem o transporte bidirecional de íons, metabólitos, aminoácidos e pequenas moléculas reguladoras (ALBERTINI et al., 2001). Segundo Luciano et al. (2000), qualquer comprometimento destas vias de comunicação resulta na redução da proliferação das CC e na indução do processo

apoptótico no COC. O aprofundamento da compreensão dessas interações fisiológicas é essencial para a melhoria da eficiência da maturação *in vitro*, permitindo o aprimoramento dos meios de cultivo, de forma a minimizar os impactos da perda da unidade folicular e do estímulo gonadotrópico não fisiológico durante a MIV.

2.3.1 Proteína morfogênica óssea 15

A proteína morfogênica óssea 15, também conhecida como GDF9B, pertence à superfamília de fatores de crescimento TGF β e atua em diversos tipos celulares em conjunto ou não com o OSF homólogo GDF9. A ação da BMP15 se dá pela interação com os receptores de membrana BMPR2, ALK6 (ou BMPR1B) e ALK3 (ou BMPR1A; MOORE et al., 2003; PULKKI et al., 2012; CHANG et al., 2013). A ativação destes receptores desencadeiam cascatas bioquímicas intracelulares relacionadas à fosforilação das proteínas Smads 1/5/8, translocando o sinal para o núcleo e regulando a transcrição de genes específicos (CHANG et al., 2002; SHIMASAKI et al., 2004).

O BMP15 tem sido correlacionado a muitas etapas da foliculogênese, controlando, em fases iniciais, o crescimento folicular relacionado à proliferação de CG e o estímulo da expressão de kit ligante nestas mesmas células (OTSUKA et al., 2000; OTSUKA et al., 2001; DI PASQUALE et al., 2004; MCNATTY et al., 2005); e, em estágios finais, a modulação do efeito de diferenciação pelo FSH e o controle da maturação folicular (PERSANI et al., 2014). Ainda, o BMP15 pode agir em processo pós-ovulatórios, como no controle da expressão de genes relacionados ao metabolismo e a expansão das CC (SU et al., 2008; Li et al., 2009; CAIXETA et al., 2013) e no aumento da aquisição de competência oocitária (HUSSEIN et al., 2006; LIN et al., 2014; PERSANI et al., 2014). Segundo Otsuka et al. (2001), o BMP15 tem a capacidade de inibir a expressão de receptores de FSH em camundongos. Consequentemente, todos os genes de expressão induzida pelo FSH, como StAR, P450scc, 3 β -HSD, receptores de LH e subunidades inibina/ativina, também serão inibidos em células da granulosa. Desta forma, o BMP15 pode ser considerado um inibidor da luteinização. Chang et al. (2013), também observaram a competência do

BMP15 em suprimir a produção de progesterona pela redução da expressão de StAR via ALK3 em células da granulosa humana. As ações e as respectivas consequências da presença da BMP15 podem alterar conforme o tipo celular pesquisado, assim como a espécie em foco, representando uma temática de ampla necessidade de estudo.

Hussein et al. (2005), de forma bastante elegante, demonstraram o papel do BMP15 na proteção das CC bovinas contra a apoptose, mesmo sob ação do agente pró-apoptótico estaurosporina. Tal defesa ocorreu de maneira gradual, sendo mais efetiva nas camadas de CC próximas ao oócito, sendo reduzida conforme o distanciamento do mesmo. Este fato corrobora com a teoria do gradiente morfogênico de OSF sobre as CC (EPPIG, 2001; HUSSEIN et al., 2005). Zhai et al. (2013) também observaram redução da apoptose em CC suínas após tratamento com BMP15, sugerindo que este OSF estivesse envolvido na regulação da expressão de genes pró-sobrevivência ou pró-apoptóticos, como CCL2 e FBN1, respectivamente.

Segundo Caixeta (2013) e Sartor (2014), a BMP15 adicionada ao meio de maturação *in vitro* resultou na maior porcentagem de COC com taxa máxima de expansão das CC. Sartor (2014), no entanto, não encontrou influência da BMP15 sobre a maturação nuclear oocitária, a taxa de CC apoptóticas e a expressão gênica de Bax (pró-apoptose) e Bcl2 (anti-apoptose). Ela relata efeito da combinação BMP15 + FGF10 na análise da apoptose em CC, porém os resultados sugerem influência preponderante da BMP15 sobre esta variável.

Portanto, o BMP15 atua de forma coordenada e eficiente na proliferação, diferenciação e apoptose celular durante o processo de foliculogênese em diversas espécies. Em decorrência da relativa importância deste OSF, muito tem sido estudado. Porém, a possível interação com o fator de crescimento fibroblástico 16 (FGF16) ao longo da maturação oocitária bovina *in vitro* ainda não foi descrita na literatura.

2.3.2 Fator de crescimento fibroblástico 16

O fator de crescimento fibroblástico 16 (FGF16) pertence à subfamília dos FGF9/16/20 (YUN-LV SUN et al., 2012), a qual apresenta similaridade de 62 a 73% na estrutura de aminoácidos (MIYAKE et al., 1998; OHMACHI et al., 2000). Segundo Miyake et al. (1998), o FGF16 humano apresenta semelhança de 98,6% na sequência peptídica em relação ao mesmo fator de crescimento em ratos. Análises por hibridização *in situ* revelaram padrões de expressão distintos para os membros dessa subfamília durante o desenvolvimento embrionário de ratos (OHMACHI et al., 2000).

O FGF16 participa do controle do desenvolvimento e do funcionamento de diversos tecidos em diferentes espécies. A expressão do FGF16 foi descrita em tecido cardíaco (fase embrionária avançada e adulta) e em tecido adiposo marrom (embrionário), participando das atividades mitogênica e proliferativa, em ratos e camundongos (MIYAKE et al., 1998; KONISHI et al., 2000; SONTAG et al., 2003; LAVINE et al., 2005; ANTOINE et al., 2006). Wright et al. (2003) avaliaram os padrões de expressão gênica de FGFs em camundongos, identificando o FGF16 como um marcador dentro da placa ótica, da vesícula ótica em desenvolvimento, do endoderma faringeal, dos arcos branquiais e da placa olfatória. Em murinos, o FGF16, assim como outros FGFs, é essencial no processo de odontogênese e na formação das rugas palatinas (PORNTAVEETUS et al., 2010, 2011). Em galinhas, notou-se a influência do FGF16 na formação do ouvido interno (CHAPMAN, 2006). Miyake et al. (1998) observou pequena, porém presente expressão de mRNA FGF16 em estômago, intestino delgado, baço e testículo de ratos.

Poucos estudos focaram o FGF16 em tecidos reprodutivos. Yun-Lv Sun et al. (2012) avaliaram a influência da subfamília FGF9/16/20 no desenvolvimento de células germinativas femininas em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), sugerindo o envolvimento desta subfamília na formação do oócito inicial. Demonstraram ainda, a expressão do FGF16 em testículos, como também observada em ratos por Miyake et al. (1998).

Machado (2012) demonstrou, por imunohistoquímica, a presença da proteína FGF16 em oócitos e células da teca de folículos antrais, sendo que as estruturas em estágio de atresia apresentaram marcação mais evidente, quando comparadas às

saudáveis, no mesmo corte histológico. Corroborando com os dados da imunohistoquímica, os níveis de mRNA do FGF16 em células somáticas foliculares mostraram-se maiores em folículos atrésicos. A adição de FSH ao meio MIV aumentou a expressão de receptores para o FGF16, FGFR2C e FGFR3C, nas células do cumulus, mas não alterou os níveis de mRNA do FGF16 nos oócitos (CAIXETA et al., 2012; MACHADO, 2012). A presença do mRNA e da proteína FGF16 no oócito, somada à expressão estimulada pelo FSH dos receptores nas células do cumulus, sugerem a inclusão da ação parácrina do FGF16 nos mecanismos de controle da diferenciação do COC. Ainda, Machado (2011) observou que a adição de FGF16 ao meio de maturação *in vitro* culminou no aumento da quantidade de COC com máxima taxa de expansão das CC bovina, porém não encontrou alteração no nível de expressão da COX2, PTX3, TNFAIP6, EREG e BTC, genes essenciais para as cascatas da maturação oocitária e expansão das CC.

Não há relatos na literatura sobre as ações específicas do FGF16 no controle da maturação do COC bovino ou sobre as possíveis interações com outros fatores oocitários. Contudo, relatos prévios demonstram a cooperação do FGF8, o qual ativa os mesmos receptores do FGF16, com a BMP15 na regulação do metabolismo do complexo cumulus oócito (COC) murino, motivando novos estudos que investiguem as ações do FGF16 e a respectiva interação com a BMP15 no controle do COC bovino (SUGIURA et al., 2007).

HIPÓTESES

3 HIPÓTESES

A suplementação do meio de MIV com os fatores de crescimento FGF16 e BMP15, separadamente, resultará em efeito benéfico ao processo de maturação *in vitro* do COC bovino, ou seja, aumentará a taxa de expansão das CC, reduzirá a incidência de fragmentação de DNA em oócitos e CC, elevará o número de oócitos com maturação nuclear, incrementará o consumo de glicose e a produção de progesterona e de lactato.

Já a adição concomitante desses fatores, culminará em resposta positiva sinérgica sobre a maturação oocitária, permitindo evidenciar um efeito superior sobre os mesmos parâmetros.

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Verificar os efeitos da suplementação do meio de maturação *in vitro* com os fatores parácrinos FGF16, BMP15 e a interação de ambos sobre o processo diferenciação do COC bovino.

4.2 ESPECÍFICO

Avaliar a influência das suplementações de FGF16 (10 ng/ml) e BMP15 (100 ng/ml), isolada e conjuntamente, sobre os parâmetros: maturação nuclear oocitária, metabolismo energético (consumo de glicose e produção de lactato), expansão das células do cumulus, fragmentação de DNA em oócitos e CC e produção de progesterona.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Complexos cumulus-oócito imaturos foram cultivados por 22 horas em 4 meios de tratamento: (1) meio MIV (Anexo A) ausente de fatores de crescimento (grupo controle), (2) meio MIV adicionado de FGF16 recombinante humano (10ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; MACHADO, 2012), (3) meio MIV suplementado com BMP15 recombinante humano (100ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; CAIXETA, 2012) e (4) meio MIV com associação de FGF16 (10ng/ml) e BMP15 (100ng/ml;). Nos momentos 0 e 22 horas, o grau de expansão do cumulus, o grau de fragmentação de DNA em oócitos e células do cumulus e a progressão da meiose foram avaliados nos COC. Ainda as concentrações de glicose, lactato e progesterona foram mensuradas a partir de amostras de meio de cultivo, prévia e posteriormente à MIV (Figura 4).

Figura 4 - Modelo esquemático do delineamento experimental

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: “FGF16”= fator de crescimento fibroblástico 16; “BMP15”= proteína morfogênica óssea 15; “COC”= complexo cumulus-oócito; “h”= hora (s).

MATERIAL E MÉTODO

6 MATERIAL E MÉTODO

6.1 OBTENÇÃO DOS COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITO

Os ovários foram obtidos de fêmeas bovinas abatidas em frigorífico comercial (Piracicaba, São Paulo – SIF 2259) e transportados em recipiente térmico contendo solução salina aquecida (35-37°C), acrescida de antibiótico. No laboratório, os ovários foram lavados com solução salina aquecida (35-37°C) para a remoção de sujidades e sangue.

Os oócitos foram removidos dos folículos ovarianos por meio da técnica de aspiração, na qual empregou-se uma seringa de 5 ml acoplada à agulha 21 G. O conteúdo coletado foi depositado em tubo de centrífuga de 15 ml em banho-maria a 37°C e mantido por 10 minutos para a sedimentação dos COC. O sedimento foi coletado com pipeta Pasteur, depositado em placa de Petri grande e diluído com meio de rastreamento (Anexo B). Todos os COC foram transferidos para uma placa de Petri pequena com meio pré-MIV (Anexo C) para posterior seleção conforme a homogeneidade de citoplasma e quantidade e disposição das camadas de células do cumulus.

6.2 MATURAÇÃO *IN VITRO*

Os COC classificados como graus I e II foram lavados três vezes em meio pré-MIV, seguido por três lavagens em meio de MIV. Grupos de 20 COC foram depositados em cada um dos 4 poços centrais da placa de 24 poços (*Corning*®), contendo 450 µL de meio de MIV previamente preparado, contendo um dos 4 tratamentos (conforme delineamento experimental e Figura 5). Foram confeccionadas, em cada replicata, 2 placas de 24 poços (nomeadas como “placa 1” e “placa 2”), utilizando-se apenas os 4 poços centrais, de modo que as condições fornecidas a cada poço fossem as mais homogêneas possíveis. Os COC foram

mantidos em incubadora a 38,5°C em atmosfera de 5% CO₂ em ar e alta umidade por 22 horas para a maturação *in vitro*.

Figura 5 – Disposição dos grupos experimentais na placa de MIV

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: "FGF16"= meio de MIV + fator de crescimento fibroblástico 16; "BMP15"= meio de MIV + proteína morfogênica óssea 15; "FGF16 + BMP15"= meio de MIV + FGF16 + BMP15.

6.3 ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

6.3.1 Análise da fragmentação de DNA e da maturação nuclear oocitária

Os COC de cada grupo da placa 2 foram denudados mecanicamente por pipetagem (em gotas de 400 µL de solução salina tamponada acrescida de polivinil pirrolidone, PBS-PVP, 1 mg/ml) para serem denudados. Conforme as CC se soltavam do COC, os oócitos foram movidos para uma nova gota de PBS-PVP e o conteúdo da gota anterior foi armazenado em tubo microcentrífuga 1,6 ml (*Eppendorf*®). O tubo foi centrifugado a $5,51 \times 10^3$ G por 4 minutos e o sobrenadante,

removido. O sedimento de células do cumulus foi ressuspensionado em 200 µL de solução de paraformaldeído 4% gelada e mantido por 1 hora em temperatura ambiente. Os oócitos completamente desprovidos de CC foram transferidos para uma gota de 200 µL de paraformaldeído 4% em condições semelhantes às das CC. Após o tempo de fixação, as células do cumulus foram centrifugadas (mesma velocidade e mesmo tempo) e o sobrenadante removido. Para a total retirada do paraformaldeído 4% das CC, foram realizadas 2 lavagens em PBS-PVP. Ao final da última centrifugação e remoção do sobrenadante, o sedimento de células do cumulus foi ressuspensionado em 400 µL de PBS-PVP e mantido a 4°C, até posterior análise. Os oócitos foram lavados em 3 gotas de 100 µL de PBS-PVP, alocados em tubo microcentrífuga 1,6 ml (*Eppendorf*[®]) contendo 400 µL de PBS-PVP e armazenados em geladeira.

De modo a não haver influência do tempo de espera, foi realizado o rodízio na ordem dos grupos a serem submetidos à pipetagem. Amostras de COC imaturos também foram obtidas como descrito acima, constituindo o grupo de “controle 0h” de oócitos e células do cumulus.

6.3.2 Mensuração de metabólitos energéticos (glicose e lactato) e progesterona

Após a remoção dos COC para as análises de fragmentação de DNA e maturação nuclear oocitária, o meio de maturação contido em cada poço foi recolhido, armazenado em tubos de microcentrífuga 1,6 ml (*Eppendorf*[®]) e mantidos a -20°C até o momento das análises. Alíquotas (100 µL) de meio de maturação de cada grupo experimental foram armazenadas previamente a adição dos oócitos, representando o “controle 0h”.

6.4 EXPANSÃO DAS CÉLULAS DO CUMULUS

Os 20 COC de cada grupo experimental (de ambas as placas) foram fotografados em microscópio invertido Olympus IX81 (Olympus Corporation, Tóquio, Japão), em aumento de 20X, antes de as placas serem colocadas na incubadora para a maturação *in vitro*. As imagens obtidas neste primeiro momento representam o “controle 0h” (COC imaturos) dos tratamentos. De modo semelhante, após 22 horas de MIV, as placas foram retiradas da incubadora, uma a uma, para a captação das imagens dos COC pós-maturação.

O intuito deste procedimento foi a mensuração virtual da área de cada COC pré- e pós-maturação, empregando o *software ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html> - Figuras 6 e 7). A partir dos resultados obtidos, foram feitas médias das áreas dos COC correspondentes de cada grupo e provenientes de cada placa (às 0h e às 22h). Para uma correta evidenciação numérica da real expansão das células do cumulus, realizou-se a subtração da média da área obtida pré-maturação do valor obtido após a maturação, respeitando os tratamentos e as placas de cada replicata. Deste modo, foi possível remover as possíveis variações decorrentes da heterogeneidade do material e da aleatória divisão dos COC de cada grupo. Isso porque, as mesmas estruturas foram fotografadas no início e no término da maturação, sendo apenas importante a diferença entre as médias das áreas nos dois momentos (coluna roxa do Apêndice A). A unidade empregada para esta análise foi arbitrária (UA), sendo os valores obtidos utilizados comparativamente entre os grupos. Foram analisadas 4 replicatas.

Figura 6 – Imagens fotográficas representando a mensuração virtual da área do COC pré-maturação

Fonte: (DELGADO, J. C., 2013).

Legenda: Aumento 20x.

Figura 7 – Imagens fotográficas representando a mensuração virtual da área do COC pós-maturação

Fonte: (DELGADO, J. C., 2013).

Legenda: Aumento 20x.

6.5 FRAGMENTAÇÃO DE DNA EM OÓCITOS E MATURAÇÃO NUCLEAR OOCITÁRIA

O protocolo empregado (Figura 8) na análise da fragmentação de DNA em oócitos é uma adaptação do descrito por Paula-Lopes et al. (2007). Em suma, os oócitos previamente fixados em paraformaldeído 4% foram transferidos para uma placa de 96 poços, contendo 100 μ L de PBS-PVP/poço/tratamento. Os oócitos foram incubados em gotas de 100 μ L de solução de permeabilização (Anexo D) por 1 hora em câmara úmida e escura a temperatura ambiente. Após a realização de 3 lavagens em gotas de 100 μ L de PBS-PVP, os oócitos destinados aos grupos

controle positivo e negativo da técnica (2 representantes de cada tratamento) foram transferidos a uma placa Petri pequena, contendo uma gota de 100 µL de solução de DNase (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA; Anexo E). Tal incubação se deu por 1 hora em câmara úmida e escura a 37 °C. Os grupos dos tratamentos permaneceram em PBS-PVP, sob as mesmas condições ambientais dos controles de técnica. Os oócitos incubados em DNase foram lavados 3 vezes em gotas de 100 µL de PBS-PVP. A partir desta etapa, todos os procedimentos foram elaborados no escuro.

Para a realização da análise de fragmentação de DNA, foi utilizado o *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* (Roche, Applied Science, Suíça), seguindo as instruções do fabricante. Os diferentes grupos foram incubados nas soluções 1 e 2 (proporção 1:9) do Kit TUNEL, por 1 hora em câmara úmida e escura a 37 °C. O controle negativo recebeu somente a solução 2. Os oócitos foram lavados em 3 gotas de 100 µL de PBS-PVP e alocados em lâminas contendo gota de 7 µL de *ProLong Diamond Antifade Mountant* com DAPI (Molecular Probes, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific EUA). As lâminas foram cobertas por lamínulas e analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus IX8) em amplificação de 40x. A coloração em azul corresponde à marcação nuclear, permitindo a análise da maturação nuclear oocitária. As marcações em verde, em locais correspondentes ao núcleo, indicam a presença de fragmentação de DNA nos oócitos.

Foram considerados “maturados”, os oócitos em estágios de anáfase I em diante, quando já era possível identificar a formação, e posterior compactação, do CP, diferenciando-o do PNF. Oócitos entre as fases de vesícula germinativa e metáfase I receberam a nomenclatura de “imaturos”. A taxa de maturação de cada grupo foi obtida pela divisão do número de oócitos maturados por grupo pelo valor de oócitos totais do mesmo. Para este estudo, foram realizadas 5 replicatas.

Os oócitos que apresentavam fragmentação apenas no CP, não foram consideradas como “células fragmentadas”. Tal nomenclatura foi somente adotada para oócitos que tivessem marcação positiva para TUNEL, tanto no CP quanto no PNF (ANGUITA et al., 2007) ou apenas no PNF. De forma semelhante à taxa de maturação, a taxa de fragmentação de DNA foi determinada a partir da razão entre o número de células fragmentadas por grupo pelo valor total de oócitos do mesmo. A análise foi realizada em 6 replicatas.

Figura 8 – Esquema do protocolo de TUNEL em oócitos

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: “C+” = controle positivo da técnica; “C-” = controle negativo da técnica; “Sol. Perm.” = solução de permeabilização; “PBS-PVP”= solução salina tamponada acrescida de polivinil pirrolidone; “FGF16”= fator de crescimento fibroblástico 16; “BMP15”= proteína morfogênica óssea 15.

6.6 FRAGMENTAÇÃO DE DNA EM CÉLULAS DO CUMULUS

As etapas realizadas para a análise da fragmentação de DNA em CC foram adaptações do protocolo descrito no item 6.5. Gotas de 100 µL das amostras armazenadas em geladeira (CC provenientes de 20 COC + 400 µL PBS-PVP), foram pipetadas sobre lâminas e mantidas em platina aquecedora a 37 °C, até a completa evaporação do PBS-PVP e a adesão das células na superfície da lâmina. Para cada tratamento e controles positivo e negativo da técnica, foram confeccionadas 2

lâminas para a avaliação. Sobre cada grupo de células, foram depositados 50 µL de solução de permeabilização, homogeneamente distribuídos na superfície. Tal incubação se deu em câmara úmida e escura a temperatura ambiente. As lâminas foram cuidadosamente lavadas em água ultra pura (Milliq) com o auxílio de uma piceta e mantidas em platina aquecedora para secar. Sobre as lâminas referentes aos controles de técnica, foi adicionada e homogeneamente distribuída uma gota de 30 µL de solução de DNase (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA). Todas as lâminas foram mantidas em câmara úmida e escura a 37 °C. Após a incubação, os grupos que estavam em DNase foram lavados em água Milliq. A partir desta etapa, os procedimentos foram elaborados no escuro. Para a realização da análise de fragmentação de DNA, foi utilizado o *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* (Roche, Applied Science, Suíça), adaptando as instruções do fabricante para a análise em lâmina. As soluções de TUNEL foram preparadas conforme descrito no item 6.5 e aplicadas sobre os grupos. As lâminas foram cobertas por lamínula e mantidas por 1 hora em câmara úmida e escura a 37 °C. Ao final, as lamínulas foram removidas e as lâminas, lavadas em Milliq. Foi adicionada uma gota de 7 µL de *ProLong Diamond Antifade Mountant* com DAPI (Molecular Probes, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific EUA) sobre cada grupo celular e recolocada a lamínula. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência (Olympus IX8) em amplificação de 40x, permitindo observar as marcações azul (nuclear) e verde (fragmentação de DNA). A obtenção da taxa de fragmentação de DNA em CC foi desenvolvida de forma semelhante à análise em oócitos. Foram analisadas 5 replicatas.

6.7 PRODUÇÃO DE PROGESTERONA

Alíquotas de meio de maturação (150 µL) de cada tratamento (provenientes de 8 replicatas) foram enviadas para o laboratório de empresa Genese (São Paulo, SP), onde foi realizada, em duplicata, a técnica de radioimunoensaio para a mensuração de progesterona. O kit empregado no ensaio foi o *RIA Progesterone* (Immunotech, França) e os procedimentos seguiram as indicações do fabricante. Para a quantificação do valor inicial de progesterona presente na amostra, foi

realizada a mensuração deste componente a partir de um pool de meios pré-maturação correspondentes às replicatas que sofreram a mensuração pós-MIV. Com ambas as informações, foi possível obter o dado referente à produção de progesterona em cada grupo, por meio da diferença do valor final pelo inicial.

6.8 CONSUMO DE GLICOSE E PRODUÇÃO DE LACTATO

Para a mensuração dos valores de glicose e lactato antes e após a maturação *in vitro*, alíquotas de 220 μ L foram enviadas para o Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da UNESP-Botucatu. Os kits utilizados nestes ensaios foram o *Slides GLU (VITROS Chemistry Products, Ortho-Clinical Diagnostics, Rochester, EUA)* e *Slides LAC (VITROS Chemistry Products, Ortho-Clinical Diagnostics, Rochester, EUA)*, respectivamente. A variável “consumo de glicose” foi obtida a partir da subtração da quantidade inicial deste componente pela final do mesmo. A variável “produção de lactato” foi elucidada pela diferença entre o valor final e o inicial mensurados. Para cada estudo, foram analisadas alíquotas provenientes de 8 replicatas experimentais.

6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo programa *SAS System for Windows 9.3* e verificados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, sendo transformados no caso de necessidade (Quadro 1). Foi utilizado o procedimento GLM do programa e realizada a análise de comparação de médias pelo procedimento Duncan. Correlações de *Spearman* foram utilizadas para calcular a relação entre as variáveis paramétricas. O nível de significância de 0,05 foi considerado para correlações significativas. Correlações baixas apresentaram valor do coeficiente de correlação (r) menor do que 0,30 (30%), enquanto que correlações altas apresentaram valor de r maior do que 0,30 (30%).

Quadro 1 - Variáveis e respectivas transformações aritmeticamente para o cumprimento das premissas estatísticas

Variável	Transformação
Fragmentação de DNA – oócito	$\arcsin(\sqrt{\text{fragmOOC}})$
Fragmentação de DNA – célula do cumulus	$\log_{10}(\text{fragmCC})$
Produção de lactato	$\log_{10}(\text{prodact})$
Produção de progesterona	$\log_{10}(\text{prodprog})$

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: “fragmOOC” = fragmentação de DNA – oócito; “fragmCC” = fragmentação de DNA – células do cumulus; “prodact” = produção de lactato; “prodprog” = produção de progesterona.

RESULTADOS

7 RESULTADOS

De forma sintética, todos os resultados obtidos neste estudo, assim como as médias (dos grupos e das replicatas), os erros padrão da média e os valores de p, estão compilados nos quadros presentes nos apêndice B e C.

7.1 EXPANSÃO DAS CÉLULAS DO CUMULUS

Por meio da mensuração gráfica das áreas dos COC e da diferença do valor final (pós-maturação) pelo inicial (COC imaturo), foi observado efeito de tratamento sobre a variável “expansão das células do cumulus” ($p=0,0071$). O fator de crescimento BMP15 ($11,34 \pm 1,09$ UA), de modo semelhante à sua atuação conjunta ao FGF16 ($11,34 \pm 0,61$ UA), causou um grau de expansão maior ao dos grupos de COC maturados em meio de MIV com FGF16 ($9,42 \pm 0,65$ UA) ou sem suplementação ($8,73 \pm 0,44$ UA; Figura 9). Não houve diferença entre os valores obtidos nos grupos controle e FGF16.

Foi também observada diferença significativa entre as replicatas empregadas nesta análise ($p=0,0042$), sendo esta explicada pela não-homogeneidade do material obtido do frigorífico, uma vez que a procedência e as condições etária, sanitária e nutricional dos rebanhos abatidos não é conhecida (Apêndice D).

Figura 9 - Gráfico de efeito dos tratamentos para a variável “expansão das células do cumulus”

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: As barras de erro representam a média $\pm$ o erro padrão da média. As letras divergentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). “C”= controle (meio MIV sem suplementação); “F”= COC tratados em meio MIV + FGF16; “B”= COC maturados em meio MIV + BMP15; “FB”= COC cultivados em meio MIV + FGF16 + BMP15; “UA”= unidade arbitrária.

7.2 FRAGMENTAÇÃO DE DNA EM OÓCITO

Para efetuar tal análise de modo correto e sem viés, foram apenas avaliados os oócitos em que o CP e o PNF fossem distinguíveis entre si e que as eventuais células do cumulus residuais não comprometessem a visualização de ambos. Apenas foram considerados “fragmentados”, os oócitos que apresentassem marcação positiva no CP e no PNF ou apenas no PNF, uma vez que a presença de fragmentação no DNA do CP não prejudica a aquisição de capacidade de desenvolvimento do oócito (Figura 10).

Figura 10 - Perfis de fragmentação de DNA em oócitos maturados

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: (a) e (a') oócito considerado "fragmentado", pois apresenta marcação positiva para TUNEL no corpúsculo polar (seta vermelha) e no pró-núcleo feminino (seta amarela); (b) e (b') oócito sem fragmentação de DNA, portanto, negativo para a análise. (c) e (c') oócito considerado "não-fragmentado", pois possui apenas marcação positiva para TUNEL no corpúsculo polar (seta), sendo o pró-núcleo feminino, negativo. Imagens da coluna esquerda - (a), (b) e (c) - evidenciam o núcleo celular, emitindo a fluorescência da coloração com DAPI. Na coluna da direita - (a'), (b') e (c') -, os núcleos dos oócitos, quando da presença de fragmentação de DNA, emitindo fluorescência da coloração TUNEL (verde). O oócito apresenta *background* em citoplasma à colorações como estas, porém não compromete a realização da análise. Aumento de 40x.

No presente estudo, a suplementação do meio de MIV com o fator de crescimento BMP15 resultou na menor taxa de fragmentação de DNA em oócito ($3,81 \pm 2,76 \%$), sendo diferente ($p=0,036$) do grupo suplementado com FGF16 ($31,13 \pm 7,81 \%$). Este tratamento (FGF16) demonstrou um comportamento de fragmentação de DNA em oócitos estatisticamente semelhante ao observado nos grupos sem suplementação ($12,40 \pm 5,81 \%$) e adicionado de FGF16+BMP15 ($13,12 \pm 7,14 \%$; Figura 11).

Não foi observado efeito de replicata sobre a variável ($p=0,1207$), como pode ser evidenciado no apêndice E.

Figura 11 - Gráfico de efeito dos tratamentos para a variável “fragmentação de DNA em oócitos”

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: As barras de erro representam a média $\pm$ o erro padrão da média. As letras divergentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). “C”= controle (meio MIV sem suplementação); “F”= COC tratados em meio MIV + FGF16; “B”= COC maturados em meio MIV + BMP15; “FB”= COC cultivados em meio MIV + FGF16 + BMP15; “Fragm”= fragmentação; “OOC”= oócito.

7.3 FRAGMENTAÇÃO DE DNA EM CÉLULAS DO CUMULUS

A fragmentação de DNA das células do cumulus foi avaliada em microscopia de epifluorescência por meio da adaptação do protocolo de TUNEL empregado para oócitos. O método estabelecido foi validado, atuando de forma específica e marcando apenas os núcleos que apresentassem fragmentação de material genético (Figura 12).

Semelhantemente ao tópico anterior, pôde ser observada uma menor taxa de fragmentação de DNA em células do cumulus provenientes de COC maturados com suplementação de BMP15 ($11,73 \pm 1,24$ %). Esta taxa é significativa quando comparada às dos grupos controle ($16,04 \pm 1,45$ %) e FGF16 ($22,54 \pm 2,80$ %; $p=0,0015$). O grupo maturado na presença de FGF16 apresentou alta taxa de fragmentação de DNA, sendo esta diferente dos valores referentes ao dos demais grupos (Figura 13).

Não foi encontrado efeito de replicata sobre a variável ($p=0,9726$). Os valores das médias e dos desvios padrão por replicata estão apresentados no apêndice F.

Figura 12 - Ensaio TUNEL para células do cumulus

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: (a) e (a') controle negativo; (b), (b'), (c) e (c') diferentes proporções de fragmentação de DNA nas populações celulares demonstradas. Imagens da coluna da esquerda - (a), (b) e (c) - evidenciam o núcleo emitindo a fluorescência da coloração com DAPI (azul). Na coluna da direita - (a'), (b') e (c') -, os núcleos celulares, quando da presença de fragmentação de DNA, emitindo fluorescência da coloração TUNEL (verde). Aumento de 40x.

Figura 13 - Gráfico de efeito dos tratamentos para a variável “fragmentação de DNA em células do cumulus”

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: As barras de erro representam a média $\pm$ o erro padrão da média. As letras divergentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). “C”= controle (meio MIV sem suplementação); “F”= COC tratados em meio MIV + FGF16; “B”= COC maturados em meio MIV + BMP15; “FB”= COC cultivados em meio MIV + FGF16 + BMP15; “Fragm”= fragmentação; “CC”= célula do cumulus.

7.4 MATURAÇÃO NUCLEAR OOCITÁRIA

O status nuclear dos oócitos foi acessado por meio de coloração com DAPI e visualizado em microscópio de epifluorescência. Foram considerados “maturados” os oócitos em estágios de anáfase I em diante, quando já foi possível identificar a formação e, posterior, compactação do CP, diferenciando-o do PNF. Oócitos entre as fases de vesícula germinativa e metáfase I receberam a nomenclatura de “imaturos” (Figura 14).

Foi observado efeito de tratamento sobre a variável “maturação nuclear” ($p = 0,014$). O grupo de COC cultivados em meio de MIV suplementado com BMP15 ($93,60 \pm 4,03$) apresentou maior taxa de oócitos maturados, aproximando-se da totalidade. O valor obtido do grupo FGF16 ($76,75 \pm 2,28$) foi significativamente menor do que o encontrado nos grupos BMP15 e FGF16+BMP15 ($89,00 \pm 2,86$), porém não diferiu do controle ($80,80 \pm 2,49$ %; Figura 15).

Figura 14 - Classificações empregadas na análise de maturação nuclear oocitária

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: (a), (b), (c) e (d) representam oócitos maturados; (e) e (f) classificados como imaturos. Oócitos corados com DAPI, evidenciando o status do material genético. Aumento de 40x.

Figura 15 - Gráfico de efeito dos tratamentos para a variável “maturação nuclear oocitária”

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: As barras de erro representam a média $\pm$ o erro padrão da média. As letras divergentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). “C”= controle (meio MIV sem suplementação); “F”= COC tratados em meio MIV + FGF16; “B”= COC maturados em meio MIV + BMP15; “FB”= COC cultivados em meio MIV + FGF16 + BMP15.

Não houve efeito de replicata sobre os valores apresentados ($p=0,9145$). Os dados correspondentes a esta avaliação podem ser acessados no apêndice G.

7.5 PRODUÇÃO DE PROGESTERONA

Para uma melhor compreensão do comportamento hormonal dos COC perante os tratamentos propostos no estudo, optou-se por mensurar a produção de progesterona a partir do meio de maturação às 22 horas de MIV.

A média das amostras coletadas do grupo de COC maturados em meio de MIV+BMP15 apresentou a maior taxa de produção de progesterona ($10,79 \pm 0,72$ ng/ml), sendo diferente dos grupos controle e suplementado com FGF16 ($8,38 \pm 0,39$ ng/ml e $8,84 \pm 0,45$ ng/ml, respectivamente; $p=0,0019$; Figura 16). Não foi observada diferença entre os valores obtidos dos grupos controle, FGF16 e FGF16+BMP15 ($10,14 \pm 0,36$).

Ainda, foi verificado efeito de replicata sobre a variável ($p=0,0113$), explicado pela heterogeneidade do material obtido do abatedouro (rebanho não-padronizado). Os valores referentes às médias e aos desvios padrão por replicata, estão dispostos no apêndice H.

Figura 16 - Gráfico de efeito dos tratamentos para a variável “produção de progesterona”

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: As barras de erro representam a média $\pm$ o erro padrão da média. As letras divergentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). “C”= controle (meio MIV sem suplementação); “F”= COC tratados em meio MIV + FGF16; “B”= COC maturados em meio MIV + BMP15; “FB”= COC cultivados em meio MIV + FGF16 + BMP15.

7.6 CONSUMO DE GLICOSE E PRODUÇÃO DE LACTATO

Os resultados obtidos nas mensurações do consumo de glicose e da produção de lactato pelos COC demonstram a existência de efeito de replicata sobre os valores das variáveis ($p=0,0265$ e $p=0,0191$, respectivamente). Ao analisar o efeito dos tratamentos, não foi possível encontrar diferença significativa entre eles (consumo de glicose, $p=0,9213$; produção de lactato, $p=0,6776$, Figura 17). Contudo, não se pode afirmar seguramente a inexistência de efeito dos tratamentos, uma vez que a influência das replicatas, em decorrência da heterogeneidade do material,

pode comprometer a evidência das verdadeiras contribuições dos fatores de crescimento. Os dados obtidos das análises por replicata de ambas as variáveis estão disponíveis nos apêndices I (consumo de glicose) e J (produção de lactato).

Figura 17 - Gráficos de efeito dos tratamentos para as variáveis “consumo de glicose” (quadro superior) e “produção de lactato” (quadro inferior)

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: As barras de erro representam a média $\pm$ o erro padrão da média. “C”= controle (meio MIV sem suplementação); “F”= COC tratados em meio MIV + FGF16; “B”= COC maturados em meio MIV + BMP15; “FB”= COC cultivados em meio MIV + FGF16 + BMP15.

7.7 CORRELAÇÃO DAS VARIÁVEIS DEPENDENTES

À análise de *Spearman*, todas as variáveis deste estudo apresentaram algum tipo de correlação, permitindo a melhor compreensão de cascatas de fenômenos fisiológicos e da conexão entre elas e o possível entendimento da contribuição que os fatores de crescimento proporcionam ao processo de maturação oocitária.

Pôde-se observar que o parâmetro “fragmentação de DNA em oócito” apresentou alta correlação positiva com a variável “produção de lactato” e, de maneira negativa, com a variável “maturação nuclear oocitária”. Ainda, houve tendência de correlação positiva entre os parâmetros “fragmentação de DNA em oócito”, “fragmentação de DNA em células do cumulus” e “consumo de glicose”.

A variável “fragmentação de DNA em células do cumulus” demonstrou alta correlação positiva com os parâmetros “consumo de glicose” e “produção de lactato”.

De forma semelhante, a variável “maturação nuclear oocitária” se correlacionou significativamente e de forma positiva com “produção de progesterona” e “expansão das células do cumulus”. Este último parâmetro apresentou tendência de correlação positiva com as variáveis “produção de progesterona” e “produção de lactato”.

Por fim, o parâmetro “consumo de glicose” possuiu alta correlação com a variável “produção de lactato”.

O quadro de correlação das variáveis dependentes, apresentando os valores de probabilidade (p) e coeficiente de correlação (r), pode ser observado no quadro 2.

Quadro 2 - Correlações das variáveis dependentes, valores de probabilidade (p) e coeficientes de correlação (r)

	Fragmentação de DNA em oócito	Fragmentação de DNA em célula do cumulus	Maturação nuclear oocitária	Expansão das células do cumulus	Produção de progesterona	Consumo de glicose	Produção de lactato
Fragmentação de DNA em oócito	1	r = 0.59331 p = 0.0922	r = -0.65385 p = 0.0024	r = 0.01108 p = 0.9687	r = 0.09995 p = 0.6500	r = 0.40417 p = 0.0558	r = 0.43218 p = 0.0394
Fragmentação de DNA em célula do cumulus		1	r = -0.11765 p = 0.7631	r = 0.03571 p = 0.9394	r = -0.29121 p = 0.3344	r = 0.79670 p = 0.0011	r = 0.82806 p = 0.0005
Maturação nuclear oocitária			1	r = 0.66058 p = 0.0269	r = 0.48237 p = 0.0365	r = -0.05475 p = 0.8238	r = -0.04697 p = 0.8486
Expansão das células do cumulus				1	r = 0.44412 p = 0.0848	r = 0.37380 p = 0.1538	r = 0.48406 p = 0.0574
Produção de progesterona					1	r = 0.07667 p = 0.6818	r = -0.00182 p = 0.9923
Consumo de glicose						1	r = 0.87187 p = <.0001
Produção de lactato							1

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014). Legenda: Valores de p vermelho = correlação significativa (<0,05) ; azul = correlação com tendência de efeito significativo (0,05 < p < 0,10). Correlação Rosa – correlação média e alta (maior que 30%) ; Verde – correlação baixa (menor que 30%).

DISCUSSÃO

8 DISCUSSÃO

O intuito do presente estudo foi avaliar as possíveis influências dos fatores de crescimento FGF16 e/ou BMP15 sobre as mais relevantes variáveis da maturação oocitária *in vitro*. Para isso, COC de graus 1 e 2 foram maturados *in vitro* de acordo com os tratamentos propostos (controle/MIV, MIV+FGF16, MIV+BMP15 e MIV+FGF16+BMP15). Amostras de COC, CC, oócitos e meio de maturação foram coletados e armazenados para a posterior análise da expansão das CC, da fragmentação de DNA em CC e oócitos, da maturação nuclear oocitária, da produção de progesterona e de lactato e do consumo de glicose.

O efeito positivo da BMP15 sobre o metabolismo da progesterona é inédito na literatura até o momento. Ainda, os resultados relacionados ao FGF16 (excetuando a variável “expansão das CC”) foram descritos pela primeira vez neste estudo. As pesquisas existentes avaliam a ação destes fatores de crescimento sobre outros tecidos ou sob diferentes formas de análise.

A suplementação do meio de MIV com a BMP15 resultou no aumento da taxa de expansão das células do cumulus de COC bovinos, quando comparado aos grupos controle e MIV+FGF16. Tais resultados corroboram com os dados de Caixeta et al. (2013) e Sartor (2014), os quais observaram maior porcentagem de COC com expansão máxima de CC nas gotas de meio suplementadas com BMP15 na mesma dose do presente estudo. O aumento desta variável por ação da BMP15 pode ser justificado pela influência deste sobre genes correlatos à cascata ovulatória e de expansão das CC, como ADAM10, ADAM 17, AREG, EREG, HAS2, PTGS2, PTX3 e TSG6 (CAIXETA et al., 2013). Uma segunda fonte de contribuição do BMP15 à expansão das CC se dá pelo possível estímulo do metabolismo de glicose, especialmente da via das hexosaminas que culmina na síntese de AH, principal componente da matriz extracelular. No trabalho de Caixeta et al. (2013), foi evidenciado o maior consumo de glicose pelas CC provenientes de COC bovinos tratados com BMP15. Estes mesmos pesquisadores notificaram a maior expressão gênica do facilitador de transporte da glicose 1 (GLUT1) e das L-glicosamina:D-frutose-6-fosfato acetil transferase 1/2 (GFPT1/2). No presente estudo, não foi possível confirmar a influência da BMP15 sobre a produção de glicose em decorrência da heterogeneidade do material obtido do frigorífico, uma vez que os

rebanhos abatidos provêm de diferentes produtores e lotes, sem seleção por idade, raça ou linhagem genética. Como um terceiro fator que justifique o efeito positivo da BMP15 sobre a expansão das CC está o incremento na produção de progesterona. Este hormônio, juntamente com a prostaglandina E2, atuam na diferenciação terminal do COC, mediando a expansão das CC e a retomada da meiose (SHIMADA; TERADA, 2002; SHIMADA et al., 2004; WANG et al., 2006). O efeito benéfico da BMP15 na expansão das CC também foi obtido por Yoshino et al. (2006) em murinos e pode ser associado ao melhor desenvolvimento oocitário e embrionário (FURNUS et al., 1998; HUSSEIN et al., 2006, 2011; LIN et al., 2014; PERSANI et al., 2014).

Não foi observado efeito positivo significativo do FGF16 sobre tal expansão, sugerindo o não envolvimento deste fator com a variável em questão. Machado (2011) relatou efeito do FGF16 sobre a expansão das CC, nas quais este fator de crescimento causou aumento da variável, porém não houve alteração dos níveis de expressão de genes correlatos à cascata ovulatória e expansão das CC. A hipótese de que o FGF16 e a BMP15 atuem de forma sinérgica não foi confirmada pelos dados do presente trabalho, apesar da cooperação da BMP15 com o FGF8 (que ativa os mesmos receptores que o FGF16) na promoção da glicólise relatada em CC de murinos (SUGIURA et al., 2007). A expansão relativamente menor das CC no grupo controle deste estudo pode ser reflexo da ausência de suplementação com soro fetal bovino (SFB) ao meio de MIV. Como a intenção foi avaliar os efeitos dos OSF sob condições definidas, decidiu-se não suplementar o meio com SFB, já que este contém diversos fatores de crescimento em concentrações desconhecidas e variáveis conforme o lote.

O ensaio de TUNEL demonstrou a significativa ação da BMP15 em prevenir a ocorrência de fragmentação de DNA e, possivelmente, da apoptose, em CC e oócitos bovinos. A literatura oferece artigos que comprovam tal proteção da BMP15 sobre as CC em diferentes espécies, porém o completo mecanismo desta cascata ainda não foi elucidado (EPPIG, 2001; HUSSEIN et al., 2005; ZHAI et al., 2013). Sugere-se que a BMP15 haja na modulação de genes pró- e anti-apopóticos, como Bax e Bcl2, respectivamente, com tendência do balanço gênico para a condição de sobrevivência celular (HUSSEIN et al., 2005; ZHAI et al., 2013). Ainda, a maior síntese de progesterona pelos COC tratados com BMP15 sugere que este hormônio expresse a possível ação anti-apoptótica sobre outras células do folículo, diferentes

das células da granulosa e luteais, como descrito por Peluso (2006). Não se sabe exatamente em que momento da cascata da apoptose a progesterona atua, porém esta, provavelmente, está relacionada à reduzida quantidade de fragmentação de DNA em CC e oócitos observada neste grupo. Concomitantemente, a BMP15 resultou no aumento da expansão das CC, permitindo inferir uma maior produção de AH. Este composto foi descrito por Kaneko et al. (2000) como um possível agente inibidor da apoptose em CC e CG em bovino, reforçando o efeito encontrado da BMP15 sobre a prevenção da fragmentação de DNA em COC bovinos. De modo divergente, Sartor (2014) observou influência da BMP15 sobre a taxa de fragmentação de DNA/apoptose em CC bovinas, empregando os ensaios de TUNEL e anexina (em citometria) e a análise da expressão gênica de Bax e Bcl2. Observando cuidadosamente os resultados de Sartor (2014), nota-se o efeito da combinação BMP15 + FGF10, estes sugerem influência preponderante da BMP15 sobre a apoptose em CC, aproximando estes resultados aos obtidos no presente estudo.

Inversamente ao encontrado para a BMP15, os COC tratados com FGF16 apresentaram maior taxa de fragmentação de DNA. A análise desta variável em CC demonstrou o único momento deste estudo em que o FGF16 se comportou de forma desfavorável à maturação, ao invés de ser indiferente ao processo. Este achado se assemelha aos resultados de Portela et al. (2010), em que o FGF18 (fator ativador dos mesmos receptores do FGF16) modula o ciclo celular e eleva a taxa de fragmentação de DNA em células da granulosa.

A suplementação da BMP15 ao meio de maturação elevou a quantidade de oócitos nos estágios de anáfase I em diante, atingindo, portanto, a maturação nuclear oocitária. Tal taxa aproximou-se da totalidade, representando um efeito positivo da BMP15 sobre esta variável. O resultado obtido na análise da maturação nuclear oocitária corrobora com os demais presentes achados referentes à BMP15, reforçando a teoria pró-MIV deste fator de crescimento. O FGF16 apresentou menor taxa de maturação nuclear em comparação ao BMP15, porém foi semelhante à encontrada no grupo controle, sugerindo a não atuação funcional do FGF16 sobre esta variável em bovinos.

Como parcialmente comentado, não foi possível confirmar o efeito dos tratamentos sobre o consumo de glicose e a produção de lactato a partir da mensuração destes componentes no meio de maturação. Caixeta et al. (2013)

observaram o maior consumo de glicose pelos COC cultivados com BMP15, porém não encontrou alteração nos níveis de produção de lactato. A divergência no resultado referente ao consumo de glicose pode ser fruto do heterogêneo material obtido do frigorífico.

De forma inédita, o presente estudo demonstra a ação positiva da BMP15 sobre a produção de progesterona pelos COC. O grupo suplementado com BMP15 apresentou valores de produção de progesterona superiores aos dos demais grupos estudados. Tendo em vista as importantes funções da progesterona na maturação oocitária (anti-apoptose, indução da expansão das CC e retomada da meiose), tal incremento de quantidade torna a BMP15 um fator essencial para a melhor aquisição do desenvolvimento oocitário e, posterior, sucesso no desenvolvimento embrionário (SHIMADA; TERADA, 2002; SHIMADA et al., 2004; PELUSO, 2006; WANG et al., 2006). De modo semelhante ao observado na análise da expansão das CC, fragmentação de DNA em oócito e maturação nuclear oocitária, o resultado da adição de FGF16 sobre a produção de progesterona não diferiu do observado no grupo controle. Estes dados sugerem fortemente o não envolvimento do FGF16 no processo de MIV bovina.

Em uma análise do comportamento das amostras do presente estudo, foi possível evidenciar uma alta correlação negativa entre a maturação nuclear oocitária e a fragmentação de DNA em oócito. Este fato é justificado pela necessidade da integridade da cromatina para o correto desempenho gênico relacionado ao processo de maturação e para a organização cromossômica final para a eventual fecundação. Seguindo o raciocínio da fisiologia folicular, a interdependência entre os componentes germinativos e somáticos foi evidenciada pela alta correlação positiva entre a maturação nuclear oocitária e a expansão das CC e tendência de correlação positiva entre a fragmentação em CC e oócito, demonstrando a necessidade de um sistema coeso.

Acredita-se que a progesterona aja na diferenciação final do COC, atuando na expansão das CC e na retomada da meiose (SHIMADA; TERADA, 2002; SHIMADA et al., 2004; WANG et al., 2006). Os dados aqui apresentados corroboram com esta teoria, evidenciando uma alta correlação positiva entre a produção de progesterona e a maturação nuclear oocitária e tendência de correlação positiva entre a produção de progesterona e a expansão das CC.

A suplementação do meio de MIV com BMP15, mimetizando o realizado no presente estudo, causa elevação no custo do procedimento. Segundo a cotação fornecida pela empresa importadora em fevereiro de 2013, o valor acrescido por oócito maturado foi de cerca de US\$ 0,18. Este valor pode ser considerado alto para um laboratório comercial de produção *in vitro* de embriões. Porém, tal custo é justificado ao ser empregado em procedimentos de PIVE que exijam maior eficiência produtiva e menor número de gametas, como: em animais de alto valor genético, em espécies em perigo extinção e na reprodução humana. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram o incremento da suplementação da BMP15 sobre relevantes parâmetros do COC ao longo da maturação *in vitro*, sendo recomendável a inclusão deste fator de crescimento nos protocolos de PIVE de amostras raras e de alto valor econômico e ético.

CONCLUSÃO

9 CONCLUSÃO

Com o presente estudo, pode-se concluir que a suplementação da BMP15 na dose de 100ng/ml ao meio de MIV foi benéfica ao processo de diferenciação do COC bovino durante a maturação oocitária *in vitro*, corroborando com a hipótese formulada. Este fator de crescimento apresentou efeito positivo sobre relevantes parâmetros da maturação, como expansão das CC, fragmentação de DNA em oócito e CC, maturação nuclear oocitária e produção de progesterona. Os dados apresentados reforçam o envolvimento da BMP15 na foliculogênese e na diferenciação do COC. Deste modo, a adição da BMP15 aos convencionais protocolos de PIV é de grande valia para elevar a efetividade desta biotecnologia.

De forma distinta, a suplementação de FGF16 na dose de 10ng/ml ao meio de MIV se mostrou indiferente ao processo de maturação. Observando o comportamento das variáveis após tal adição, foi possível afirmar que o FGF16 não tenha envolvimento nas etapas da maturação compreendidas pelo presente estudo *in vitro*, refutando a hipótese inicial.

Não foi observada ação sinérgica entre o FGF16 e a BMP15, mais uma vez contrariando a hipótese estabelecida. A cascata desencadeada pela suplementação (associada ou não), até o momento, não foi bem estabelecida. Mais estudos são necessários para elucidar os efeitos bioquímicos e biológicos do FGF16 e da BMP15 sobre a fisiologia do COC.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALBERTINI, D. F.; COMBELLES, C. M. H.; BENECHCHI, E.; CARABATSOS, M. J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p. 647-653, 2001.

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, n. 4, p. 901-905, 2002.

ANGUITA, B.; VANDAELE, L.; MATEUSEN, B.; MAES, D.; VAN SOOM, A. Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. **Theriogenology**, v. 67, n. 3, p. 537-549, 2007.

ANGUITA, B.; PARAMIO, M. T.; MORATÓ, R.; ROMAGUERA, R.; JIMÉNEZ-MACEDO, A. R.; MOGAS, T.; IZQUIERDO, D. Effect of the apoptosis rate observed in oocytes and cumulus cells on embryo development in prepubertal goats. **Animal Reproduction Science**, v. 116, n. 1-2, p. 95-106, 2009.

ANTOINE, M.; WIRZ, W.; TAG, C. G.; GRESSNER, A. M.; WYCISLO, M.; MULLER, R.; KIEFER, P. Fibroblast growth factor 16 and 18 are expressed in human cardiovascular tissues and induce on endothelial cells migration but not proliferation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 346, n. 1, p. 224-233, 2006.

APARICIO, I. M.; GARCIA-HERREROS, M.; O'SHEA, L. C.; HENSEY, C.; LONERGAN, P.; FAIR, T. Expression, regulation, and function of progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 5, p. 910-921, 2011.

ASHKENAZI, H.; CAO, X.; MOTOLA, S.; POPLIKER, M.; CONTI, M.; TSAFRIRI, A. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 77-84, 2005.

BALDI, E.; LUCONI, M.; KRAUSZ, C.; AND FORTI, G. Progesterone and spermatozoa: a long-lasting liaison comes to definition. **Human Reproduction**, v. 26, n. 11, p. 2933-2934, 2011.

BEAUMONT, H. M.; MANDL, A. M. A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 155, n. 961, p. 557-579, 1961.

BERGHE, T. V.; GROOTJANS, S.; GOOSSENS, V.; DONDELINGER, Y.; KRYSKO, D. V.; TAKAHASHI, N.; VANDENABEELE, P. Determination of apoptotic and necrotic cell death *in vitro* and *in vivo*. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 117-129, 2013.

BUCCIONE, R.; VANDERHYDEN, B. C.; CARON, P. J.; EPPIG, J. J. FSH-induced

expansion of the mouse cumulus oophorus *in vitro* is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. **Developmental Biology**, v. 138, n. 1, p. 16-25, 1990.

BUFFONE, M. G.; HIROHASHI, N.; GERTON, G. L. Unresolved questions concerning mammalian sperm acrosomal exocytosis. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 5, p. 1-8, 2014.

CAIXETA, E. S. **Regulação da expressão de fatores secretados pelo oócito (FSOS) e seus receptores durante a maturação in vitro (MIV) bovina e ações no controle da expansão do cumulus**. 2012. 116 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

CAIXETA, E. S.; MACHADO, M. F.; RIPAMONTE, P.; PRICE, C.; BURATINI, J. Effects of FSH on the expression of receptors for oocyte-secreted factors and members of the EGF-like family during *in vitro* maturation in cattle. **Reproduction Fertility and Development**, v. 25, n. 6, p. 890-899, 2013.

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

CHANG, H.; BROWN, C. W.; MATZUK, M. M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 6, p.787-823, 2002.

CHANG, H. M.; CHENG, J. C.; KLAUSEN, C.; LEUNG, P. C. BMP15 suppresses progesterone production by down-regulating StAR via ALK3 in human granulosa cells. **Molecular Endocrinology**, v. 27, n. 12, p. 2093-2104, 2013.

CHAPMAN, S. C.; CAI, Q.; BLEYL, S. B.; SCHOENWOLF, G. C. Restricted expression of FGF16 within the developing chick inner ear. **Developmental Dynamics**, v. 235, n. 8, p. 2276–2281, 2006.

CHEN, L.; RUSSELL, P. T.; LARSEN, W. J. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. **Molecular Reproduction and Development**, v. 34, n. 1, p. 87-93, 1993.

COMER, F. I.; HART, G. W. O-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29179-29182, 2000.

CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J.Y.; SU, Y.Q. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 4, p. 715-23, 2006.

CONTI, M.; HSIEH, M.; ZAMAH, A. M.; SU OH, J. Novel signaling mechanisms in the

ovary during oocyte maturation and ovulation. **Molecular and Cell Endocrinology**, v. 356, n. 1-2, p. 65-73, 2012.

CORN, C. M.; HAUSER-KRONBERGER, C.; MOSER, M.; TEWS, G.; EBNER, T. Predictive value of cumulus cell apoptosis with regard to blastocyst development of corresponding gametes. **Fertility and Sterility**, v. 84, n. 3, p. 627-633, 2005.

DI PASQUALE, E.; BECK-PECCOZ, P.; PERSANI, L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. **The American Journal of Human Genetics – Cell**, v. 75, n. 1, p. 106-111, 2004.

DODE, M. A.; DUFORT, I.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M. A. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 3, p. 288-297, 2006.

DOWNS, S. M.; HUMPHERSON, P. G.; LEESE, H. J. Meiotic induction in cumulus cell-enclosed mouse oocytes: involvement of the pentose phosphate pathway. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 4, p. 1084-1094, 1998.

DOWNS, S. M.; UTECHT, A. M. Metabolism of radiolabeled glucose by mouse oocytes and oocyte–cumulus cell complexes. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 6, p. 1446-1452, 1999.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 829-838, 2001.

EPPIG, J. J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.; HIRAO, Y. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 4, p. 976-984, 1997.

FRANK, L. A.; SUTTON-MCDOWALL, M. L.; BROWN, H. M.; RUSSELL, D. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Hyperglycaemic conditions perturb mouse oocyte *in vitro* developmental competence via beta-O-linked glycosylation of heat shock protein 90. **Human Reproduction**, v. 29, n. 6, p. 1292-1303, 2014.

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

FURNUS, C. C.; VALCARCEL, A.; DULOUT, F. N.; ERRECALDE, A. L. The hyaluronic acid receptor (CD44) is expressed in bovine oocytes and early stage embryos. **Theriogenology**, v. 60, n. 9, p. 1633-1644, 2003.

GADELLA, B. M. Dynamic regulation of sperm interactions with the zona pellucida

prior to and after fertilization. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 1, p. 26-37, 2012.

GILCHRIST, R. B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to *in vitro* maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 1, p. 23-31, 2011.

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

GILCHRIST, R. B.; 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.

GREEN, J. **A culpa é das estrelas**. Rio de Janeiro: Intrínseca, 2012. 288 p.

GUTNISKY, C.; DALVIT, G. C.; PINTOS, L. N.; THOMPSON, J. G.; BECONI, M. T.; CETICA, P. D. Influence of hyaluronic acid synthesis and cumulus mucification on bovine oocyte *in vitro* maturation, fertilisation and embryo development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 3, p. 488-497, 2007.

HALTIWANGER, R. S.; BUSBY, S.; GROVE, K.; LI, S.; MASON, D.; MEDINA, L.; MOLONEY, D.; PHILIPSBERG, G.; SCARTOZZI, R. O-glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins: regulation analogous to phosphorylation? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 231, n. 2, p. 237-242, 1997.

HARRIS, S. E.; ADRIAENS, I.; LEESE, H. J.; GOSDEN, R. G.; PICTON, H. M. Carbohydrate metabolism by murine ovarian follicles and oocytes grown *in vitro*. **Reproduction**, v. 134, n. 3, p. 415-424, 2007.

HARRIS, S. E.; LEESE, H. J.; GOSDEN, R. G.; PICTON, H. M. Pyruvate and oxygen consumption throughout the growth and development of murine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 76, n. 3, p. 231-238, 2009.

HENNET, M. L.; COMBELLES, C. M. H. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 56, n. 10-12, p. 819-831, 2012.

HERRICK, J. R.; BRAD, A. M.; KRISHER, R. L. Chemical manipulation of glucose metabolism in porcine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation *in vitro*. **Reproduction**, v. 131, n. 2, p. 289-298, 2006.

HSIEH, M.; LEE, D.; PANIGONE, S.; HORNER, K.; CHEN, R.; THEOLOGIS, A.; LEE, D. C.; THEADGILL, D. W.; CONTI, M. Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 5, p. 1914-1924, 2007.

HUSSEIN, T. S.; FROILAND, D. A.; AMATO, F.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine

gradient of bone morphogenetic proteins. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 22, p. 5257-5268, 2005.

HUSSEIN, T. S.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Developmental Biology**, v. 296, n. 2, p. 514-521, 2006.

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. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 4, p. 576-584, 2011.

HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 38, n. -, p. 35-47, 1989.

IRVING-RODGERS, H. F.; VAN WEZEL, I. L.; MUSSARD, M. L.; KINDER, J. E.; RODGERS, R. J. Atresia revisited: two basic patterns of atresia of bovine antral follicles. **Reproduction**, v. 122, n. 5, p. 761-775, 2001.

JACKSON, D. G. Immunological functions of hyaluronan and its receptors in the lymphatics. **Immunological Reviews**, v. 230, n. 1, p. 216-231, 2009.

JOLLY, P. D.; TISDALL, D. J.; HEATH, D. A.; LUN, S.; MCNATTY, K. P. Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 5, p. 934-944, 1994.

KANEKO, T.; SAITO, H.; TOYA, M.; SATIO, T.; NAKAHARA, K.; HIROI, M. Hyaluronic acid inhibits apoptosis in granulosa cells via CD441. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 17, n. 3, p. 162-167, 2000.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide- ranging implications in tissue kinetics. **British Journal Cancer - Nature**, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KONISHI, M.; MIKAMI, T.; YAMASAKI, M.; MIYAKE, A.; ITOH, N. Fibroblast growth factor-16 is a growth factor for embryonic brown adipocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 16, p. 12119-12122, 2000.

LAVINE, K. J.; YU, K.; WHITE, A. C.; ZHANG, X.; SMITH, C.; PARTANEN, J.; ORNITZ, D. M. Endocardial and epicardial derived FGF signals regulate myocardial proliferation and differentiation *in vivo*. **Developmental Cell**, v. 8, n. 1, p. 85-95, 2005.

LEE, K. S.; JOO, B. S.; NA, Y. J.; YOON, M. S.; CHOI, O. H.; KIM, W. W. Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 18, n. 9, p. 490-498, 2001.

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.

LI, Q.; RAJANAHALLY, S.; EDSON, M. A.; MATZUK, M. M. Stable expression and characterization of N-terminal tagged recombinant human bone morphogenetic protein 15. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, n. 12, p. 779-788, 2009.

LIN, Z. L.; LI, Y. H.; XU, Y. N.; WANG, Q. L.; NAMGOONG, S.; CUI, X. S.; KIM, N. H. Effects of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 on the *in vitro* maturation of porcine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 2, p. 219-227, 2014.

LISHKO, P. V.; BOTCHKINA, I. L.; KIRICHOK, Y. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. **Nature**, v. 471, n. 7338, p. 387-391, 2011.

LUCIANO, A. M.; MODINA, S.; GANDOLFI, F.; LAURIA, A.; ARMSTRONG, D. T. Effect of cell-to-cell contact on *in vitro* deoxyribonucleic acid synthesis and apoptosis responses of bovine granulosa cells to insulin-like growth factor-I and epidermal growth factor. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 6, p. 1580-1585, 2000.

LUCIANO, A. M.; MODINA, S.; VASSENA, R.; MILANESI, E.; LAURIA, A.; GANDOLF, F. Monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during *in vitro* maturation of bovine oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 2, p. 465-472, 2004.

MACHADO, M. F. **Expressão dos fatores de crescimento fibroblástico 17 e 18 (FGF-17 e FGF-18) em folículos antrais bovinos**. 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

MACHADO, M. F.; CAIXETA, E. S.; LIMA, P. F.; ORMOND, C. M.; PRICE, C. A.; SUTTON-MCDOWALL, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G.; BURATINI JR, J. Fibroblast growth factors 16 and 17 (FGF16 And FGF17) stimulate cumulus expansion in bovine cumulus-oocyte complexes. In: WORLD CONGRESS ON REPRODUCTIVE BIOLOGY, 2011, Queensland, Austrália. **Abstract...** [S.l.]: Society for Reproductive Biology, 2011.

MACHADO, M. F. **Expressão e função de membros das subfamílias FGF-8 e FGF-9 em folículos antrais bovinos**. 2012. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

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**, v. 128, n. 4, p. 379-386, 2004.

MCNATTY, K. P.; JUENGEL, J. L.; READER, K. L.; LUN, S.; MYLLYMAA, S.; LAWRENCE, S. B.; WESTERN, A.; MEERASAHIB, M. F.; MOTTERSHEAD, D. G.;

- GROOME, N. P.; RITVOS, O.; LAITINEN, M. P. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. **Reproduction**, v. 129, n. 4, p. 481-487, 2005.
- MÉNÉZO, Y.; DALE, B.; COHEN, M. DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. **Zygote**, v. 18, n. 4, p. 357-365, 2010.
- MIYAKE, A.; KONISHI, M.; MARTIN, F. H.; HERNDAY, N. A.; OZAKI, K.; YAMAMOTO, S.; MIKAMI, T.; ARAKAWA, T.; ITOH, N. Structure and expression of a novel member, FGF-16, on the fibroblast growth factor family. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 243, n. 1, p. 148-152, 1998.
- MIYANO, T.; HIRO-OKA, E.; KANO, K.; MIYAKE, M.; KUSUNOKI, H.; KATO, S. Effect of hyaluronic acid on the development of 1- and 2- cell porcine embryos to the blastocyst stage *in vitro*. **Theriogenology**, v. 41, n. 6, p. 1299-1305, 1994.
- MOORE, R. K.; OTSUKA, F.; SHIMASAKI, S. Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 1, p. 304- 310, 2003.
- MORITA, Y.; TILLY, J. L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. **Developmental Biology**, v. 213, n. 1, p. 1–17, 1999.
- MUTO, J.; MORIOKA, Y.; YAMASAKI, K.; KIM, M.; GARCIA, A.; CARLIN, A. F., VARKI, A.; GALLO, R. L. Hyaluronan digestion controls DC migration from the skin. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 3, p. 1309-1319, 2014.
- NORRIS, R. P.; RATZAN, W. J.; FREUDZON, M.; MEHLMANN, L. M.; KRALL, J.; MOVSESIAN, M. A.; WANG, H.; KE, H.; NIKOLAEV, V. O.; JAFFE, L. A. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development**, v. 136, n. 11, p. 1869-1878, 2009.
- NUTTINCK, F.; GUIENNE, B. M.; CLEMENT, L.; REINAUD, P.; CHARPIGNY, G.; GRIMARD, B. Expression of genes involved in prostaglandin E2 and progesterone production in bovine cumulus–oocyte complexes during *in vitro* maturation and fertilization. **Reproduction**, v. 135, n. 5, p. 593-603, 2008.
- OHMACHI, S.; WATANABE, Y.; MIKAMI, T.; KUSU, N.; IBI, T.; AKAIKE, A.; ITOH, N. FGF-20, a novel neurotrophic factor, preferentially expressed in the substantia nigra pars compacta of rat brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 277, n. 2, p. 355-360, 2000.
- OHTA, N.; SAITO, H.; KUZUMAKI, T.; TAKAHASHI, T.; ITO, M. M.; SAITO, T.; NAKAHARA, K.; HIROI, M. Expression of CD44 in human cumulus and mural granulosa cells of individual patients in *in vitro* fertilization programmes. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, n. 1, p. 22-28, 1999.
- O'MALLEY, B. W. A life-long search for the molecular pathways of steroid hormone action. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 6, p. 1402-1411, 2005.

O'SHEA, L. C.; HENSEY, C.; FAIR, T. Progesterone regulation of AVEN protects bovine oocytes from apoptosis during meiotic maturation. **Biology of Reproduction**, v. 89, n. 6, p. 1-13, 2013.

OTSUKA, F.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 14, p. 11387-11392, 2001.

OTSUKA, F.; YAO, Z.; LEE, T.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 50, p. 39523-39528, 2000.

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**, v. 303, n. 5658, p. 682-684, 2004.

PAULA-LOPES, F. F.; BOELHAUVE, M.; HABERMANN, F. A.; SINOWATZ, F.; WOLF, E. Leptin promotes meiotic progression and developmental capacity of bovine oocytes via cumulus cell-independent and -dependent mechanisms. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 3, p. 532-41, 2007.

PELUSO, J. J. Multiplicity of progesterone's actions and receptors in the mammalian. **Biology of Reproduction**, v. 75, n. 1, p. 2-8, 2006.

PENG, X. R.; HSEUH, A. J.; LAPOLT, P. S.; BJERSING, L.; NY, T. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell lysates during follicular development and ovulation. **Endocrinology**, v. 129, n. 6, p. 3200-3207, 1991.

PERSANI, L.; ROSSETTI, R.; DI PASQUALE, E.; CACCIATORE, C.; FABRE, S. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 6, p. 869-883, 2014.

PORNTAVEETUS, T.; OOMMEN, S.; SHARPE, P. T.; OHAZAMA, A. Expression of FGF signalling pathway related genes during palatal rugae development in the mouse. **Gene Expression Patterns**, v. 10, n. 4-5, p. 193-198, 2010.

PORNTAVEETUS, T.; OTSUKA-TANAKA, Y.; ALBERT BASSON, M.; MOON, A. M.; SHARPE, P. T.; OHAZAMA, A. Expression of fibroblast growth factors (FGFs) in murine tooth development. **Journal of Anatomy**, v. 218, n. 5, p. 534-543, 2011.

PORTELA, V. M.; MACHADO, M.; BURATINI, J.; ZAMBERLAM, G.; AMORIM, R. L.; GONCALVES, P.; PRICE, C. A. Expression and function of fibroblast growth factor 18 in the ovarian follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 3, p. 339-346, 2010.

PUBLICOVER, S.; BARRATT, C. Reproductive biology: progesterone's gateway into

sperm. **Nature**, v. 471, n. 7338, p. 313-314, 2011.

PULKKI, M. M.; MOTTERSHEAD, D. G.; PASTERNAK, A. H.; MUGGALLA, P.; LUDLOW, H.; VAN DINTHER, M.; MYLLYMAA, S.; KOLI, K.; TEN DIJKE, P.; LAITINEN, M.; RITVOS, O. A covalently dimerized recombinant human bone morphogenetic protein-15 variant identifies bone morphogenetic protein receptor type 1B as a key cell surface receptor on ovarian granulosa cells. **Endocrinology**, v. 153, n. 3, p. 1509-1518, 2012.

RICHARDS, J. S.; RUSSELL, D. L.; OCHSNER, S.; ESPEY, L. L. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. **Annual Review of Physiology**, v. 64, n. -, p. 69- 92, 2002.

SAITO, H.; SAITO, T.; HIRAYAMA, T.; NOHARA, M.; KOIKE, K.; HIROI, M. Cumulus mass maintains embryo quality. **Fertility and Sterility**, v. 62, n. 3, p. 555-558, 1994.

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-beta. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 32, p. 19517-19523, 1990.

SARTOR, D. T. J. A. **Efeitos dos Fatores de Crescimento dos Fibroblastos 2 e 10 (FGF2 e FGF10) sobre a diferenciação do complexo cumulus-oócito bovino durante a maturação *in vitro***. 2014. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

SATO, E.; ISHIBASHI, T.; KOIDE, S. S. Prevention of spontaneous degeneration of mouse oocytes in culture by ovarian glycosaminoglycans. **Biology of Reproduction**, v. 37, n. 2, p. 371-376, 1987.

SHIMADA, M.; NIHSIBORI, M.; YAMASHITA, Y.; ITO, J.; MORI, T.; RICHARDS, J. S. Down- regulated expression of A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin- like repeats-1 by progesterone receptor is associated with impaired expression of porcine cumulus-oocyte complexes. **Endocrinology**, v. 145, n. 10, p. 4603-4610, 2004.

SHIMADA, M.; TERADA, T. FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v. 8, n. 7, p. 612-618, 2002.

SHIMASAKI, S.; MOORE, R. K.; OTSUKA, F.; ERICKSON, G. F. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 1, p. 72-101, 2004.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126-136, 2006.

SLAWSON, C.; HART, G. W. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-

phosphate: the sweet side of protein regulation. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 13, n. 5, p. 631-636, 2003.

SLEVIN, M.; KRUPINSKI, J.; GAFFNEY, J.; MATOU, S.; WEST, D.; DELISSER, H.; SAVANI, R. C.; KUMAR, S. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. **Matrix Biology**, v. 26, n. 1, p. 58-68, 2007.

SLOTTE, H.; AKERLÖF, E.; POUSETTE, A. Separation of human spermatozoa with hyaluronic acid induces, and percoll inhibits, the acrosome reaction. **International Journal of Andrology**, v. 16, n. 6, p. 349-54, 1993.

SONTAG, D. P.; CATTINI, P. A. Cloning and bacterial expression of postnatal mouse heart FGF-16. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 242, n. 1-2, p. 65-70, 2003.

STRÜNKER, T.; GOODWIN, N.; BRENNER, C.; KASHIKAR, N. D.; WEYAND, I.; SEIFERT, R.; KAUPP, U. B. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. **Nature**, v. 471, n. 7338, p. 382-386, 2011.

SU, Y. Q.; SUGIURA, K.; WIGGLESWORTH, K.; O'BRIEN, M. J.; AFFOURTIT, J. P.; PANGAS, S. A.; MATZUK, M. M.; EPPIG, J. J. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. **Development**, v. 135, n. 1, p. 111-121, 2008.

SUGIURA, K.; PENDOLA, F. L.; EPPIG, J. J. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. **Developmental Biology**, v. 279, n. 1, p. 20-30, 2005.

SUGIURA, K.; SU, Y.; DIAZ, F. J.; PANGAS, S. A.; SHARMA, S.; WIGGLESWORTH, K.; O'BRIEN, M. J.; MATZUK, M. M.; SHIMASAKI, S.; EPPIG, J. J. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. **Development**, v. 134, n. 14, p. 2593-2603, 2007.

SUN, Y. L.; ZENG, S.; YE, K.; YANG, C.; LI, M. H.; HUANG, B. F.; SUN, L. N.; ZHOU, L. Y.; WANG, D. S. Involvement of FGF9/16/20 subfamily in female germ cell development of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 1427-1439, 2012.

SUTTON, M. L.; CETICA, P. D.; BECONI, M. T.; KIND, K. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. **Reproduction**, v. 126, n. 1, p. 27-34, 2003.

SUTTON-MCDOWALL, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Cumulus expansion and glucose utilisation by bovine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. **Reproduction**, v. 128, n. 3, p. 313-319, 2004.

SUTTON-MCDOWALL, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Effect of

hexoses and gonadotrophin supplementation on bovine oocyte nuclear maturation during *in vitro* maturation in a synthetic follicle fluid medium. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 17, n. 4, p. 407-415, 2005.

SUTTON-MCDOWALL, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction**, v. 139, n. 4, p. 685-695, 2010.

TERMEER, C.; SLEEMAN, J. P.; SIMON, J. C. Hyaluronan - magic glue for the regulation of the immune response? **Trends in Immunology**, v. 24, n. 3, p. 112-114, 2003.

THÉRIEN, I.; MANJUNATH, P. Effect of progesterone on bovine sperm capacitation and acrosome reaction. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 4, p. 1408-1415, 2003.

TILLY, J. L. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 11, p. 838-848, 2001.

TOOLE, B. P. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 7, p. 528-539, 2004.

TSAFRIRI, A.; CHUN, S. Y.; ZHANG, R.; HSUEH, A. J.; CONTI, M. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. **Developmental Biology**, v. 178, n. 2, p. 393-402, 1996.

TUNJUNG, W. A. S.; YOKOO, M.; HOSHINO, Y.; MIYAKE, Y.; KADOWAKI, A.; SATO, E. Effect of hyaluronan to inhibit caspase activation in porcine granulosa cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 382, n. 1, p. 160-164, 2009.

TURLEY, E. A. Hyaluronan and cell locomotion. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 11, n. 1, p. 21-30, 1992.

VACCARI, S.; WEEKS, J. L.; HSIEH, M.; MENNITI, F. S.; CONTI, M. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 3, p. 595-604, 2009.

VAN DEN STEEN, P.; RUDD, P. M.; DWEK, R. A.; OPDENAKKER, G. Concepts and principles of O-linked glycosylation. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, n. 3, p. 151-208, 1998.

VANDERHYDEN, B. C.; COHEN, J. N.; MORLEY, P. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis. **Endocrinology**, v. 133, n. 1, p. 423-426, 1993.

VAN TOL, H. T.; VAN EIJK, M. J.; MUMMERY, C. L.; VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M. M. Influence of FSH and hCG on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. **Molecular**

Reproduction and Development, v. 45, n. 2, p. 218-224, 1996.

VICENT, G. P.; BALLARE, C.; ZAURIN, R.; SARAGUETA, P.; BEATO, M. Chromatin remodeling and control of cell proliferation by progestins via cross talk of progesterone receptor with the estrogen receptors and kinase signaling pathways. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1089, n. -, p. 59-72, 2006.

WANG, H. F.; ISOBE, N.; KUMAMOTO, K.; YAMASHIRO, H.; YAMASHITA, Y.; TERATA, T. Studies of the role of steroid hormone in the regulation of oocyte maturation in cattle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, n. 4, p. 1-9, 2006.

WRIGHT, T. J.; HATCH, E. P.; KARABAGLI, H.; KARABAGLI, P.; SCHOENWOLF, G. C.; MANSOUR, S. L. Expression of mouse fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor genes during early inner ear development. **Developmental Dynamics**, v. 228, n. 2, p. 267-272, 2003.

YAGCI, A.; MURK, W.; STRONK, J.; HUSZAR, G. Spermatozoa bound to solid state hyaluronic acid show chromatin structure with high DNA chain integrity: an acridine orange fluorescence study. **Journal of Andrology**, v. 31, n. 6, p. 566-572, 2010.

YANG, R.; YAN, Z.; CHEN, F.; HANNSON, G. K.; KIESSLING, R. Hyaluronic acid and chondroitin sulphate A rapidly promote differentiation of immature DC with upregulation of costimulatory and antigen-presenting molecules, and enhancement of NF-kappaB and protein kinase activity. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 55, n. 1, p. 2-13, 2002.

YOSHINO, O.; MCMAHON, H. E.; SHARMA, S.; SHIMASAKI, S. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 28, p. 10678-10683, 2006.

YUAN, Y. Q.; VAN SOOM, A.; LEROY, J. L.; DEWULF, J.; VAN ZEVEEREN, A.; DE KRUIF, A.; PEELMAN, L. J. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. **Theriogenology**, v. 63, n. 8, p. 2147-2163, 2005.

ZHAI, B.; LIU, H.; LI, X.; DAI, L.; GAO, Y.; LI, C.; ZHANG, L.; DING, Y.; YU, X.; ZHANG, J. BMP15 prevents cumulus cell apoptosis through CCL2 and FBN1 in porcine ovaries. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 264-278, 2013.

ANEXOS

ANEXO A – Composição do meio de maturação/ MIV (6 ml)

Reagente	Quantidade	Marca	Número de catálogo
TCM-199 bicarbonato (ml)	6	Gibco	11150-059
Albumina Sérica Bovina (g)	0,024	Sigma	A7511
Piruvato (µl)	12	Sigma	P3662
Amicacina (µl)	30	NovaFarma	-
Hormônio Folículo Estimulante (µl)	6	Bioniche	DIN 02350017
Hormônio Luteinizante (µl)	60	Bioniche	DIN 02267500

ANEXO B – Composição do meio de rastreamento (30 ml)

Reagentes	Quantidade	Marca	Número de catálogo
TCM-199 HEPES (ml)	27	Gibco	12350-039
Soro Fetal Bovino 10% (ml)	3	Gibco	16140-014
Piruvato (µl)	150	Sigma	P4562
Gentamicina (µl)	60	Sigma	G-1264

ANEXO C – Composição do meio pré-MIV (10 ml)

Reagentes	Quantidade	Marca	Número de catálogo
TCM-199 HEPES (ml)	9	Sigma	7528
Soro Fetal Bovino Inativado (ml)	1	Sigma	F4135
Piruvato (µl)	50	Sigma	P3662
Amicacina (µl)	20	NovaFarma	-

ANEXO D – Composição da solução de permeabilização

Reagentes	Quantidade	Marca	Número de catálogo
Triton X – 100	0,5 % (v/v)	Sigma	X-100
Citrato de sódio	0,1 % (v/v)	Sigma	S-4641

ANEXO E – Composição da solução de DNase

Reagentes (Alíquotas)	Quantidade	Marca	Número de catálogo
PBS - PVP (1 mg/ml)	1 ml	-	-
DNase	1 µl	Invitrogen	18047-019

Reagentes (Solução de uso)	Quantidade	Marca	Número de catálogo
Solução 1	27,5 µl	-	-
PBS - PVP (1 mg/ml)	72,5 µl	-	-

APÊNDICES

APÊNDICE A - Exemplificação das mensurações realizadas por replicata

	Média da área dos 20 COC	Momentos de mensuração		Área 22h - área 0h
		0h MIV	22h MIV	
P1	Controle	C 0h P1	C 22h P1	C 22h P1 - C 0h P1
	FGF16	F 0h P1	F 22h P1	F 22h P1 - F 0h P1
	BMP15	B 0h P1	B 22h P1	B 22h P1 - B 0h P1
	FGF16 + BMP15	FB 0h P1	FB 22h P1	FB 22h P1 - FB 0h P1
P2	Controle	C 0h P2	C 22h P2	C 22h P2 - C 0h P2
	FGF16	F 0h P2	F 22h P2	F 22h P2 - F 0h P2
	BMP15	B 0h P2	B 22h P2	B 22h P2 - B 0h P2
	FGF16 + BMP15	FB 0h P2	FB 22h P2	FB 22h P2 - FB 0h P2

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: "P1" = placa 1; "P2" = placa 2; "COC"= complexo cumulus-oócito; "h"= hora (s); "MIV"= maturação *in vitro*; "FGF16"= fator de crescimento fibroblástico 16; "BMP15"= proteína morfogênica óssea 15.

APÊNDICE B - Tabela dos resultados estatísticos (média $\pm$ erro padrão da média e valor de p) referentes às análises por tratamento

	C	F	B	FB	Valor de p
Expansão das células do cumulus (UA)	8,73 $\pm$ 0,44 ^b	9,42 $\pm$ 0,65 ^b	11,34 $\pm$ 1,09 ^a	11,34 $\pm$ 0,61 ^a	0,0071
Fragmentação de DNA em oócito (%)	12,4 $\pm$ 5,81 ^{ab}	31,13 $\pm$ 7,81 ^a	3,81 $\pm$ 2,76 ^b	13,12 $\pm$ 7,14 ^{ab}	0,036
Fragmentação de DNA em célula do cumulus (%)	16,04 $\pm$ 1,45 ^b	22,54 $\pm$ 2,80 ^a	11,73 $\pm$ 1,24 ^c	12,09 $\pm$ 0,82 ^{bc}	0,0015
Maturação nuclear oocitária (%)	80,80 $\pm$ 2,49 ^{bc}	76,75 $\pm$ 2,28 ^c	93,60 $\pm$ 4,03 ^a	89,00 $\pm$ 2,86 ^{ab}	0,014
Produção de progesterona (ng/ml)	8,38 $\pm$ 0,39 ^c	8,84 $\pm$ 0,45 ^{bc}	10,79 $\pm$ 0,72 ^a	10,14 $\pm$ 0,36 ^{ab}	0,0019
Consumo de glicose (pmol/COC/h)	2123,58 $\pm$ 108,54	2120,03 $\pm$ 152,79	2034,80 $\pm$ 153,17	2151,99 $\pm$ 188,80	0,9213
Produção de lactato (pmol/COC/h)	4787,64 $\pm$ 275,70	4672,59 $\pm$ 306,19	4442,47 $\pm$ 215,53	4832,39 $\pm$ 351,90	0,6776

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: As letras divergentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). "C"= controle (meio MIV sem suplementação); "F"= COC tratados em meio MIV + FGF16; "B"= COC maturados em meio MIV + BMP15; "FB"= COC cultivados em meio MIV + FGF16 + BMP15; "UA"= unidade arbitrária.

APÊNDICE C - Tabela dos resultados estatísticos (média ± erro padrão da média e valor de p) referentes às análises por replicata

	1	2	3	4	5	6	7	8	Valor de p
Expansão CC (UA)	10,87 ± 0,92 ^{ab}	8,66 ± 0,50 ^b	9,47 ± 0,68 ^b	11,84 ± 0,72 ^a					0,0042
Fragm. OOC (%)	22,63 ± 9,44	8,50 ± 6,59	16,98 ± 12,49	2,70 ± 1,56	5,55 ± 5,55	27,95 ± 6,25			0,1207
Fragm. CC (%)	18,34 ± 4,42	15,70 ± 2,24	17,82 ± 2,62	14,70 ± 3,09	15,27 ± 1,01				0,9726
Mat. nuclear (%)	86,50 ± 4,66	82,25 ± 4,15	88,75 ± 6,52	80,75 ± 2,92	90,33 ± 5,04				0,4195
Prod. prog. (ng/ml)	9,06 ± 0,87 ^b	10,16 ± 0,58 ^{ab}	9,14 ± 0,88 ^b	11,25 ± 1,12 ^a	9,11 ± 0,84 ^b	8,49 ± 0,28 ^b	8,51 ± 0,63 ^b	11,30 ± 0,65 ^a	0,0113
Cons. glic. (pmol/COC/h)	1761,36 ± 181,16 ^c	2492,90 ± 287,00 ^a	1718,75 ± 115,10 ^c	2365,06 ± 259,69 ^{ab}	2443,18 ± 118,27 ^{ab}	2002,84 ± 71,96 ^{abc}	1910,51 ± 68,98 ^{bc}	2166,19 ± 88,61 ^{abc}	0,0265
Prod. lact. (pmol/COC/h)	4448,86 ± 324,75 ^{bc}	5842,33 ± 518,29 ^a	4039,77 ± 256,53 ^c	4781,25 ± 513,70 ^{bc}	5228,69 ± 189,47 ^{ab}	4257,10 ± 163,54 ^{bc}	4218,75 ± 134,48 ^{bc}	4653,41 ± 154,82 ^{bc}	0,0191

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: As letras divergentes indicam diferença estatística significativa (p<0,05). “Fragm.”= fragmentação de DNA; “CC”= células do cumulus; “UA”= unidade arbitrária; “OOC”= oócitos; “Mat.”= maturação; “Prod”= produção; “prog.”= progesterona; “glic.”= glicose; “lact.”= lactato.

APÊNDICE D - Gráfico de efeito de replicata para a variável “expansão das células do cumulus”

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: As barras de erro representam a média $\pm$ o erro padrão da média. As letras divergentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). “C”= controle (meio MIV sem suplementação); “F”= COC tratados em meio MIV + FGF16; “B”= COC maturados em meio MIV + BMP15; “FB”= COC cultivados em meio MIV + FGF16 + BMP15; “UA”= unidade arbitrária.

APÊNDICE E - gráfico de efeito de replicata para a variável “fragmentação de DNA em oócitos”

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: As barras de erro representam a média $\pm$ o erro padrão da média. “C”= controle (meio MIV sem suplementação); “F”= COC tratados em meio MIV + FGF16; “B”= COC maturados em meio MIV + BMP15; “FB”= COC cultivados em meio MIV + FGF16 + BMP15; “Fragm”= fragmentação; “OOC”= oócito.

APÊNDICE F - Gráfico de efeito de replicata para a variável “fragmentação de DNA em células do cumulus”

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: As barras de erro representam a média $\pm$ o erro padrão da média. “C”= controle (meio MIV sem suplementação); “F”= COC tratados em meio MIV + FGF16; “B”= COC maturados em meio MIV + BMP15; “FB”= COC cultivados em meio MIV + FGF16 + BMP15; “Fragm”= fragmentação; “CC”= célula do cumulus.

APÊNDICE G - Gráfico de efeito de replicata para a variável “maturação nuclear oocitária”

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: As barras de erro representam a média $\pm$ o erro padrão da média. “C”= controle (meio MIV sem suplementação); “F”= COC tratados em meio MIV + FGF16; “B”= COC maturados em meio MIV + BMP15; “FB”= COC cultivados em meio MIV + FGF16 + BMP15.

APÊNDICE H - Gráfico de efeito de replicata para a variável “produção de progesterona”

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: As barras de erro representam a média $\pm$ o erro padrão da média. As letras divergentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). “C”= controle (meio MIV sem suplementação); “F”= COC tratados em meio MIV + FGF16; “B”= COC maturados em meio MIV + BMP15; “FB”= COC cultivados em meio MIV + FGF16 + BMP15.

APÊNDICE I - Gráfico de efeito de replicata para a variável “consumo de glicose”

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: As barras de erro representam a média $\pm$ o erro padrão da média. As letras divergentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). “C”= controle (meio MIV sem suplementação); “F”= COC tratados em meio MIV + FGF16; “B”= COC maturados em meio MIV + BMP15; “FB”= COC cultivados em meio MIV + FGF16 + BMP15.

APÊNDICE J - Gráfico de efeito de replicata para a variável “produção de lactato”

Fonte: (DELGADO, J. C., 2014).

Legenda: As barras de erro representam a média $\pm$ o erro padrão da média. As letras divergentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). “C”= controle (meio MIV sem suplementação); “F”= COC tratados em meio MIV + FGF16; “B”= COC maturados em meio MIV + BMP15; “FB”= COC cultivados em meio MIV + FGF16 + BMP15.