

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA**

**MATURAÇÃO OOCITÁRIA ASSOCIADA À  
ESTEROIDOGÊNESE. PAPEL DO SORO SANGUÍNEO,  
ALBUMINA SÉRICA E HORMÔNIOS ESTERÓIDES.**

**GISELE ZOCCAL MINGOTI**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para a  
obtenção do título de Doutor em Fisiologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alzira Amélia Martins Rosa e Silva

Ribeirão Preto

1999

## Resumo

---

Este estudo demonstrou que oócitos bovinos são capazes de progredir normalmente a maturação nuclear até a fase de M II quando cultivados *in vitro* na presença ou ausência de células da granulosa, na presença ou ausência de soro de vaca nas diversas fases do ciclo estral e/ou SFB e na presença de BSA. A progesterona promoveu um retardo na retomada da meiose, mas não impediu que os oócitos atingissem M II, exceto na concentração de 2,5 µg/ml. Além de promover um retardo inicial na retomada da meiose, a testosterona também prejudicou a progressão da meiose até M II. O estradiol também promoveu este retardo inicial, mas isto foi revertido no final da cultura, onde se verificou que quanto maior a concentração de estradiol até a dose de 5,0 µg/ml, maior a porcentagem de oócitos que atingiram M II. Porém, não se observou diferença significativa da porcentagem de oócitos que atingiram M II após maturação no grupo controle (TCM199 com BSA) e nos grupos onde se adicionou estradiol ao meio, em concentrações crescentes. Verificou-se que as células da granulosa e/ou células do *cumulus* foram capazes de secretar progesterona e estradiol no meio de cultura, quando estimuladas pelo soro bovino, que lhes forneceu precursores (testosterona). As células do *cumulus* dos COCs cultivados foram capazes de secretar progesterona quando estimuladas por BSA, SFB e estradiol e foram capazes de secretar estradiol quando estimuladas por BSA, progesterona e testosterona. O trabalho demonstrou que a MIV de oócitos bovinos ocorre normalmente na ausência de soro bovino e na ausência de células foliculares e demonstrou que a adição de estradiol não afeta a maturação e é desnecessária, uma vez que as células do *cumulus* o produzem no meio durante as 24 horas de cultura.

## Introdução e Revisão de Literatura

### *1 - Desenvolvimento pré-natal do ovário bovino*

Em mamíferos, a oogênese tem início na vida fetal e termina meses ou anos mais tarde, dependendo da espécie (Baker, 1972). Após um processo de crescimento celular e redistribuição de organelas citoplasmáticas, as células germinativas primordiais no ovário se multiplicam ativamente e são transformadas em oogônias (Gordon, 1994). Ao final da proliferação mitótica, que ocorre ao redor do dia 50 no bovino, as oogônias entram na fase de pré-leptóteno e leptóteno da primeira prófase meiótica. Durante o pré-leptóteno ocorre a replicação final do DNA, preparando a oogônia para a meiose e é esta atividade sintética que sinaliza a transformação da oogônia em oócitos primários. Estes oócitos então progridem para as fases de leptóteno e zigóteno. Durante o zigóteno, há o pareamento dos cromossomos homólogos bivalentes, compostos de 4 cromátides. Nesta fase, o oócito primário cresce devido ao aumento do núcleo e também ao aumento do número e distribuição das organelas citoplasmáticas (Baker, 1971). Em sequência, os oócitos entram em paquíteno, que é caracterizado pelo *crossing over* e recombinação entre as cromátides (Gordon, 1994). Ao final da vida pré-natal, os oócitos passam pelo diplóteno e entram no estágio dictióide, onde permanecem até próximo à ovulação, quando retomam a meiose.

### *2 - O ovário bovino na vida pós-natal*

#### *2.1 - Desenvolvimento folicular*

O folículo é a unidade funcional do ovário e tem como funções proporcionar um microambiente para o crescimento e maturação do oócito e ainda é responsável pela produção de hormônios esteróides e peptídicos (Gordon, 1994).

Existem 3 tipos básicos de folículos ovarianos: (1) folículos primordiais; (2) folículos em crescimento, nos quais os oócitos estão em crescimento e há aumento no número de células foliculares e de suas camadas; (3) folículos vesiculares, no qual o oócito está plenamente crescido, envolto por células da granulosa e uma camada de células da teca diferenciada (Erickson, 1966 a,b). Por ocasião do nascimento, existem

no ovário bovino em torno de 120.000 a 150.000 folículos primários ou primordiais, 200 a 500 folículos em crescimento e 20 a 50 folículos antrais (Yang et al., 1998).

No início da vesiculação o folículo possui 2 a 7 camadas de *stratum granulosum* e uma fina camada de células do estroma ao redor do folículo (Marion et al., 1968). Na maioria das vezes, o *cumulus oophorus* e o *stratum granulosum* são contínuos. A camada de células da teca consiste de uma camada de células glandulares envoltas por uma camada de células externas fibrosas (Gordon, 1994). Durante a fase de crescimento folicular, as células granulosa diferenciam-se em duas subpopulações organizadas: (1) células da granulosa murais epiteliais pseudoestratificadas em contato com a membrana basal que envolve o folículo e (2) células do *cumulus* que envolvem o oócito e se unem por *gap junctions* ao oócito e às células da granulosa murais. As células do *cumulus* são consideradas um subtipo das células da granulosa, mas retém algumas propriedades fisiológicas das células da granulosa, incluindo ligação às gonadotrofinas e secreção de esteróides. No folículo pré-ovulatório, elas diferem quanto a resposta às gonadotrofinas, que estimulam as células do *cumulus* a produzir e secretar ácido hialurônico, mas não exercem este efeito nas células da granulosa.

No início do estro, o folículo tem 10 mm de diâmetro que dentro de 24 horas aumenta para 16 a 18 mm. O pico pré-ovulatório de gonadotrofinas que precede a ovulação estimula a expansão das células do *cumulus* e a transformação das células da granulosa em células luteais (Gordon, 1994).

### 3 - Regulação da maturação oocitária

Desde que a fertilização *in vitro* (FIV) tornou-se uma realidade, tem-se dado crescente atenção ao conhecimento acerca dos eventos fisiológicos em períodos críticos do desenvolvimento do gameta feminino, como crescimento do folículo e do oócito e sua maturação. Vários fatores atuam de maneira a tornar o oócito imaturo hábil para ser normalmente fertilizado e se desenvolver em um embrião viável. A maturação inadequada, seja do núcleo ou do citoplasma, inviabiliza a fecundação e aumenta as ocorrências de polispermia, de partenogênese e de bloqueio do desenvolvimento embrionário. A presente revisão aborda alguns dos fatores que influenciam o processo maturacional do oócito bovino.

### *3.1 - Influência do tamanho do folículo na competência do oócito*

Em mamíferos, o oócito deve completar sua fase de crescimento até atingir um tamanho crítico antes que possa adquirir competência para maturação. Em bovinos, o oócito continua a crescer durante o desenvolvimento do folículo antral (Motlik et al., 1986) e deve alcançar o diâmetro de 110  $\mu\text{m}$  para que possa adquirir a competência meiótica (Fair et al., 1995). Devido a isto, as taxas de maturação e de clivagem ou de obtenção de blastocistos de oócitos maturados, fertilizados e cultivados *in vitro* (IVMFC) que sejam provenientes de folículos pequenos (1-2 mm), é pequena quando comparadas àquelas provenientes de folículos de tamanho médio (2-5 mm) ou grande (5-8 mm) (Yang et al., 1998).

O baixo desenvolvimento de oócitos derivados de folículos pequenos deve-se a fatores intrínsecos do próprio oócito, que ainda não adquiriu competência nuclear e citoplasmática, o que pode ser confirmado pelas baixas taxas de desenvolvimento após ativação partenogênética de oócitos derivados de folículos pequenos ou muito pequenos (Yang et al., 1998). Por outro lado, oócitos derivados de folículos médios ou grandes demonstram maior habilidade em desenvolver-se até blastocisto após ativação partenogênética. A transferência de núcleo ou de citoplasma de oócitos derivados de folículos pequenos para oócitos derivados de folículos médios resulta numa menor porcentagem de obtenção de blastocistos, indicando que tanto o núcleo quanto o citoplasma destes oócitos não demonstram possuir habilidade para o desenvolvimento do oócito (Yang et al., 1998).

### *3.2 - Síntese de proteínas durante o crescimento e maturação do oócito*

A habilidade de desenvolvimento adquirida pelo oócito durante o processo de crescimento e maturação deve-se em grande parte à síntese de proteínas que ocorre nestas ocasiões (Sirard et al., 1992; Tatemoto et al., 1995; Sirard et al., 1998).

A MIV de oócitos bovinos depende da síntese de várias proteínas distintas que são expressas em diferentes tempos de cultura e que tem papel de ordenar a sequência de eventos que culmina com a maturação do oócito (Khatir et al., 1998; Wu et al., 1996). Além das proteínas envolvidas na GVBD (quebra da vesícula germinativa) que são sintetizadas durante as primeiras horas de cultivo (Motlik et al., 1990), marcadas

alterações na síntese de proteínas e fosforilação são observadas no oócito bovino (Kastrop et al., 1990).

Uma proteína de 28 kD presente no oócito entre 0 e 8 horas de cultura, parece estar envolvida na transição do estágio de GVBD para metáfase I (M I). Após 4 a 20 horas de cultura, há o aparecimento de uma proteína de 48 kD, cuja síntese cai novamente após 20 horas de cultura (Khatir et al., 1998). Provavelmente, esta proteína trata-se da ciclina-B. Esta ciclina é parte integral de uma molécula MPF ativa (fator promotor da meiose) e se associa com cdc32, atuando em eventos específicos de fosforilação-defosforilação para se tornar ativada. Esta ciclina-B está ausente nos oócitos bovinos quando são retirados do folículo ovariano (Sirard et al., 1998; Lévesque et al., 1996), mas é sintetizada durante a maturação. Oócitos bovinos demonstram níveis relativamente baixos de atividade MPF (histona H1 quinase) no estágio de GV (vesícula germinativa), durante as primeiras 8 horas de maturação. A atividade MPF aumenta gradualmente e ocorre o primeiro pico de atividade entre 12 a 14 horas de maturação (provável estágio de MI), seguido por uma redução abrupta na atividade entre 16 a 18 horas, durante as fases de anáfase e telófase. A atividade MPF aumenta novamente, alcançando um platô entre 20 a 24 horas de maturação (estágio de metáfase II – M II) que se mantém por várias horas e então cai gradualmente após 30 horas de maturação (Yang, 1997).

Ao final da maturação de oócitos bovinos, verifica-se a diminuição de uma proteína de 45 kD (Khatir et al., 1998). Esta proteína identificada como actina é um dos maiores produtos sintéticos do oócito imaturo (Schroeder et al., 1995) e a diminuição da síntese desta proteína parece ser uma característica essencial do processo normal de maturação (Le Gal et al., 1992).

Uma outra proteína de 67 kD, cuja síntese aumenta por volta de 16 horas de cultura, parece influenciar a progressão da meiose para M II (Khatir et al., 1998).

Portanto, a progressão nuclear durante a MIV de oócitos bovinos relaciona-se à alterações da síntese protéica do próprio oócito, sendo anteriormente demonstrado que COCs (complexos *cumulus*-oócito) imaturos possuem 4 fases de síntese de proteínas durante o período de 24 horas de maturação: proteínas necessárias para GVBD, para progressão para M I, para progressão para M II e, finalmente, para manutenção em M II (Sirard et al., 1989).

### 3.3 - Papel das células foliculares

O oócito e a população de células da granulosa, tanto da parede do folículo quanto do *cumulus*, encontram-se interconectados por uma rede extensiva de canais transmembrana conhecidos como *gap junctions*. Cada *gap junction* é composta por 6 subunidades idênticas (hexâmeros de proteína pertencentes à família das conexinas) arranjadas de maneira a formar um poro central (Loewenstein, 1987). Moléculas menores que 1000 daltons podem passar através destes poros hidrofílicos, dirigindo-se do citoplasma de uma célula à outra célula vizinha.

As funções fisiológicas das *gap junctions* no folículo são diversas, fornecendo suporte nutricional (Brower & Schultz, 1982), transmitindo sinais elétricos e transportando moléculas mensageiras das células foliculares ao oócito. Segundo-mensageiros como cAMP e cálcio podem passar através das *gap junctions* para as células vizinhas, propagando sinais induzidos por estimulação hormonal (Lawrence et al., 1978). Desta maneira, a comunicação celular via *gap junctions* é um importante mecanismo através do qual o folículo atua como uma unidade coordenadora e sincronizadora, determinando a continuidade do crescimento e desenvolvimento ou a atresia de um folículo (Wiessen & Midgley, 1994).

Estudos sugerem que o fator inibidor que controla a retomada da meiose seja produzido pelas células da teca e/ou granulosa (Foote et al., 1969). Entretanto, há controvérsias sobre a necessidade do contato entre COCs e células foliculares para a manutenção do bloqueio da meiose ( De Loss et al., 1994; Sirard et al., 1993). No bovino, verifica-se uma perda dramática das *gap junctions* das células do *cumulus* durante a retomada da meiose, mas as ligações remanescentes permanecem funcionais até a M II (Sutovsky et al., 1993). Desta maneira, tem sido proposto que a diminuição das *gap junctions* é um fato cronologicamente relacionado à maturação do oócito, mas parece que além disto, outros fatores são necessários para controlar o bloqueio da meiose (Wert et al., 1989).

A presença das células do *cumulus* é benéfica para obtenção de embriões bovinos após FIV, pois oócitos desnudos tem uma taxa de clivagem muito baixa. Além do *cumulus*, a adição de células da granulosa à cultura estimula não somente a taxa de clivagem, mas ainda o desenvolvimento até blastocisto (Mochizuki et al., 1991).

### 3.4 - Efeitos da adição de soro e albumina bovina ao meio de cultura

Soro e albumina sérica bovina (BSA) são as fontes protéicas mais comumente utilizadas como suplemento do meio de cultura para produção *in vitro* de embriões bovinos.

A adição de soro bovino ao meio de MIV, seja soro fetal bovino (SFB) ou soro de vaca nas diversas fases do ciclo estral, não influencia a taxa de oócitos atingindo M II (Mingoti et al., 1995) uma vez que a maturação nuclear é um processo completamente independente de suplementação sérica do meio (Suss et al., 1988).

Por outro lado, o soro exerce um efeito bifásico no desenvolvimento *in vitro* de embriões (Pinyopummintr & Bavister, 1991; Pinyopummintr & Bavister, 1994; Bavister, 1995). Enquanto prejudica o desenvolvimento inicial do embrião, estimula o desenvolvimento de mórulas até o estágio de blastocisto, acelerando o processo de blastulação (Wang et al., 1997), aumentando o número de células do blastocisto e estimulando a eclosão (Pinyopummintr & Bavister, 1991; Pinyopummintr & Bavister, 1994).

Antes da clivagem, não há diferença entre a suplementação do meio com BSA ou SFB. Entretanto, SFB promove maior desenvolvimento embrionário pós-clivagem, principalmente após o estágio de mórula até blastocisto (Wang et al., 1997).

Tem sido sugerido que o efeito do soro no desenvolvimento embrionário deve-se aos fatores de crescimento presentes. Entretanto, a IVMFC de embriões em meio quimicamente definido suplementado com uma grande variedade de fatores de crescimento não aumenta o desenvolvimento embrionário (Flood et al., 1993).

Certamente, além dos fatores de crescimento, outras substâncias encontradas no soro, como aminoácidos (Keskintepe et al., 1995; Kim et al., 1993), substratos energéticos, vitaminas (Takahashi et al., 1992), peptídeos e proteínas, dentre outros, influenciam o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

### 3.5 - Efeitos das gonadotrofinas hipofisárias e hormônios esteróides

As gonadotrofinas exercem um efeito fundamental no processo de maturação do oócito. A maturação nuclear ocorre *in vivo* após o pico de LH (Sirard et al., 1989). Por outro lado, o LH não influencia a expansão do *cumulus* e nem a maturação nuclear de

oócitos cultivados *in vitro* na ausência de FSH ou cAMP (Eppig, 1980; Salustri et al., 1985), mas exerce estes efeitos quando FSH está presente (Eppig, 1991). De acordo com Gonçalves et al. (1996), várias hipóteses explicam a ação do LH. Primeiro, o FSH pode estimular o aparecimento de receptores de LH nas células do *cumulus*, permitindo que o LH ative mensageiros intracelulares. Segundo, o LH pode induzir um aumento nos níveis de cAMP que pode ser potencializado pelos níveis de cAMP gerados pelo FSH. O cAMP então ativa proteínas quinases e fosforilações protéicas intracelulares. Ainda, o LH pode estimular outros segundo-mensageiros que juntamente com cAMP regulam a resposta celular.

Outros mecanismos pelos quais o LH influencia a maturação de oócitos bovinos incluem a alteração da distribuição de cálcio no ooplasma e a elevação do metabolismo de glutamina no oócito. As gonadotrofinas também promovem aumento da glicólise e aumento da oxidação mitocondrial da glicose em COCs (Zuelke & Brackett, 1992; Zuelke & Brackett, 1993; Zuelke et al., 1991).

O FSH induz a maturação do oócito incluso no *cumulus*, mas não de oócitos desnudos (Eppig & Downs, 1987), indicando que o FSH estimula a produção de uma substância sinalizadora pelas células somáticas, que induz a retomada da meiose (Downs et al., 1988; Fagbohun & Downs, 1992). Assim, o efeito do FSH no oócito requer a presença das células do *cumulus* para o início da síntese de uma substância ativadora da meiose (Downs et al., 1988), mas o contato íntimo entre oócito e células da granulosa não é essencial para a subsequente secreção desta substância (Byskov et al., 1997).

Vários estudos tem demonstrado que as células da granulosa murais agem estimulando a retomada da meiose em oócitos bovinos (Liebfried & First, 1979). A retomada da meiose ocorre durante o período onde a esteroidogênese folicular é drasticamente alterada, resultando no acúmulo de precursores de esteróides, dentre os quais dois MAS (esterol ativador da meiose) já isolados e caracterizados, que ativam a retomada da meiose em oócitos de camundongo. Estes esteróis são: derivado de fluido de folículo pré-ovulatório humano (FF-MAS) e derivado de tecido testicular de touro (T-MAS) (Byskov et al., 1995). Provavelmente o FSH age estimulando a secreção destes esteróis pelas células do *cumulus*, os quais atuam paracrinamente ativando a retomada da meiose tanto em COCs quanto em oócitos desnudos (Byskov et al., 1997).

A adição de FSH à cultura também estimula a produção de progesterona (Vanderhyden et al., 1993), cuja ação na maturação oocitária não está bem estabelecida. A secreção de progestágenos aumenta tardiamente no período pré-ovulatório em folículos expostos ao LH *in vivo* e *in vitro* (Hillensjo et al., 1976; McNatty, 1978). Uma vez que a elevação de progesterona ocorre próximo à ovulação, quando a maturação oocitária está se completando, estima-se que ela não interfere com a retomada da meiose ou com a facilitação da maturação induzida pela queda anterior da concentração de outros esteróides no folículo (Smith & Tenney, 1980).

O estradiol, por sua vez, exerce diversas ações no desenvolvimento folicular, sensibilizando as células da granulosa para a resposta às gonadotrofinas e estimulando a proliferação e diferenciação das células da granulosa (Gordon, 1994). Apesar dos efeitos do estradiol na maturação nuclear de oócitos bovinos não serem ainda bem definidos, sabe-se que atua de maneira benéfica e por isso é tradicionalmente adicionado ao meio de cultura para MIV. Entretanto, quando presente em altas concentrações, parece ter um efeito prejudicial provavelmente ao exercer um efeito adverso na formação do fuso e na extrusão do corpúsculo polar (Kruip et al., 1988).

### *3.6 - Efeito dos fatores de crescimento*

Uma variedade muito grande de fatores de crescimento celular, incluindo fator de crescimento de fibroblasto, interleucina 1, fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), fator de crescimento semelhante à insulina II (IGF-II), fator de crescimento epidermal (EGF), dentre outros, são encontrados no ovário e atuam na função de células ovarianas (Hammond et al., 1993; Rieger et al., 1998). O IGF-I tem demonstrado estimular e aumentar a taxa de MIV de oócitos bovinos (Harper & Brackett, 1993). O IGF-I, assim como a insulina, estimula a proliferação das células da granulosa *in vitro* e, na presença de FSH, estimula também a produção de estradiol e progesterona (Spicer et al., 1993). A insulina também estimula a expansão do *cumulus* em COCs e aumenta a taxa de fertilização e o número de células por embrião (Zhang et al., 1991a; Zhang et al., 1991b).

O EGF, na presença de FSH, aumenta a proporção de oócitos que se desenvolvem até blastocisto após a fertilização (Harper & Brackett, 1993). Quando associados, IGF-I e EGF juntos estimulam a maturação nuclear de oócitos bovinos em

uma proporção maior do que quando adicionados individualmente à cultura (Lorenzo et al., 1995). Além disto, também estimulam a expansão do *cumulus*, o metabolismo oxidativo e a clivagem após FIV (Rieger et al., 1998).

Face aos vários fatores citados, verifica-se que a maturação de oócitos de mamíferos envolve eventos complexos extremamente interligados. O sucesso da maturação envolve a sincronia entre maturação nuclear e citoplasmática que estão sob influência de hormônios, proteínas, segundo-mensageiros, fatores de crescimento, células foliculares, dentre outros.

Visando avaliar a ação de alguns dentre os vários fatores citados, o principal objetivo proposto para o presente trabalho foi o de estudar a maturação e a esteroidogênese pelas células da granulosa e/ou pelas células do *cumulus oophorus* de COCs bovinos cultivados *in vitro* na presença de soro fetal bovino ou soro fetal bovino associado à soro de vaca nas diversas fases do ciclo estral. Adicionalmente, seguindo-se a tendência atual de exclusão de soro bovino e células foliculares de protocolos para produção *in vitro* de embriões bovinos, face aos aspectos sanitários, este trabalho teve por objetivo subsequente estudar a maturação e a esteroidogênese pelas células do *cumulus oophorus* de COCs bovinos cultivados *in vitro* na presença de BSA associado ou não à concentrações crescentes dos hormônios esteróides progesterona, testosterona e estradiol.

## **Material e Métodos**

---

### *1 - Colheita de oócitos*

Os oócitos foram aspirados de ovários de vacas e novilhas encaminhadas ao abate. Os ovários foram coletados em matadouro e transportados ao laboratório em frascos estéreis contendo solução salina fosfatada (PBS) aquecida a 37°C. No laboratório, o excesso de gordura e tecidos subjacentes foi removido dos ovários, que foram lavados em PBS aquecido a 37°C.

Para aspiração dos folículos, utilizou-se uma agulha de calibre 18 conectada a bomba à vácuo ou à uma seringa. Subsequentemente, procedeu-se a inspeção do fluido folicular em placa de Petri sob lupa estereoscópica para a coleta dos COCs. Para remoção dos COCs, utilizou-se uma pipeta Gilson P20 com ponteira esterilizada e os selecionados foram então depositados numa placa de cultivo celular (35 mm de diâmetro - Corning) contendo meio de lavagem de oócitos aquecido a 39°C.

Somente os oócitos com *cumulus* compacto, citoplasma de coloração marrom e aspecto homogêneo (finas granulações) foram utilizados nos experimentos, excluindo-se aqueles de formato irregular, coloração escura ou vacuolização/granulação citoplasmática. Oócitos cujo *cumulus* apresentou-se atrésico ou pouco compacto e oócitos desnudos também foram descartados. Após classificação, os COCs foram lavados 2 vezes em meio de lavagem e seguiram para MIV.

### *2 - Maturação in vitro I. Efeito do soro bovino como suplemento do meio de cultura.*

A maioria dos estudos relacionados à obtenção *in vitro* de embriões bovinos utiliza meio de maturação suplementado com soro bovino e/ou BSA como fonte protéica, embora não exista uma unanimidade dos pesquisadores quanto a este procedimento, tratando-se de uma opção por parte dos laboratórios. Este experimento objetivou comparar a produção *in vitro* de embriões quando a maturação foi conduzida em meio de cultura suplementado com soro fetal bovino associado ou não à soro de vaca nas diversas fases do ciclo estral.

Os COCs selecionados foram lavados duas vezes em meio de colheita e uma vez no meio de maturação, sendo então transferidos para a placa de cultura, contendo 6 ml de meio de maturação e  $2,5 \times 10^6$  a  $3 \times 10^6$  de células da granulosa por placa. O experimento foi dividido no seguinte protocolo:

### *2.1 - Efeito da adição de soro bovino ao meio de cultura*

- 1) Grupo controle SS (n=10): meio de maturação TCM199 (Sigma), 22 µg/ml de piruvato, 50 µg/ml de gentamicina, sem suplementação sérica (SS).
- 2) Grupo controle SFB (n=7): meio de maturação TCM199 (Sigma), 22 µg/ml de piruvato, 50 µg/ml de gentamicina, 10% de soro fetal bovino (SFB).
- 3) Grupo SFB+SVP (n=9): meio de maturação TCM199 (Sigma), 22 µg/ml de piruvato, 50 µg/ml de gentamicina, 5% de SFB mais 5% de soro de vaca no proestro (SVP).
- 4) Grupo SFB+SVE (n=7): meio de maturação TCM199 (Sigma), 22 µg/ml de piruvato, 50 µg/ml de gentamicina, 5% de SFB mais 5% de soro de vaca no estro (SVE).
- 5) Grupo SFB+SVM (n=8): meio de maturação TCM199 (Sigma), 22 µg/ml de piruvato, 50 µg/ml de gentamicina, 5% de SFB mais 5% de soro de vaca no metaestro (SVM).

Os oócitos foram incubados a 38.5°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> em ar, durante 24 horas. No momento em que as placas foram postas na estufa (tempo zero de cultura) e após 6, 12 e 24 horas do início da maturação, foi aliqotado 1 ml de meio de maturação, sendo estocado em freezer (-20°C) para posterior dosagem de esteróides.

Ao término do cultivo, os oócitos foram desnudos mecanicamente com o processo de pipetagem, lavados e montados sobre lâmina e lamínula (n = 22 grupo SS; n = 48 grupo SFB; n = 59 grupo SFB+SVP; n = 25 grupo SFB+SVE; n = 60 grupo SFB+SVM). Foram então fixados por 24 horas em metanol e ácido acético glacial (3:1) e corados com lacmóide (1% em ácido acético glacial) para observação da fase de maturação nuclear. Considerou-se como maturados os oócitos que apresentaram o corpúsculo polar no espaço perivitelino e que possuíam o complemento da cromatina

materna (estádio denominado metáfase II - M II). A análise foi realizada em microscópio marca Leitz Fluovert (x1000).

### *2.2 - Obtenção de células da granulosa*

Em cada experimento, selecionou-se um folículo pré-ovulatório (5 a 8 mm de diâmetro), de aspecto claro e proeminente vascularização (CATT, 1990). O folículo dissecado foi transferido para uma placa de cultivo contendo meio de colheita, sendo então rompido para liberação do oócito e fluido folicular. Sendo o oócito e as células da granulosa de boa qualidade, procedeu-se a eversão do folículo que após dupla lavagem em meio de colheita, foi gentilmente raspado com auxílio de uma pinça, liberando as células da granulosa da superfície interna do folículo.

Após determinação do número de células em câmara hematocimétrica procedeu-se a diluição para as placas de cultura, de maneira a obter  $2,5 \times 10^6$  a  $3 \times 10^6$  de células da granulosa por placa, cujo volume de meio de maturação foi padronizado em 6 ml.

### *2.3 - Obtenção do soro bovino utilizado como suplemento do meio de cultura*

Para obtenção de soro bovino nas diversas fases do ciclo estral, induziu-se ao cio vacas da subespécie *Bos taurus indicus*, raça Nelore, administrando-se 1 ampola de cloprostenol (Ciosin - Pitman-Moore Brasil S.A.) via intra-muscular. No dia anterior ao provável cio (quarto dia após estimulação), colheu-se o sangue dos animais e no dia seguinte, colheu-se o sangue do animal que apresentou cio. Desta forma, obteve-se o soro da única doadora responsiva ao tratamento, colhendo-o nas fases de proestro (dia anterior ao cio), estro (detectado por observação, com base no critério de aceitação de monta) e metaestro (dia seguinte ao cio). O sangue obtido foi imediatamente centrifugado a 2500 rpm durante 20 minutos a 4°C, filtrado, aliquotado e conservado em freezer a -20 °C.

### *3 - Maturação in vitro II. Efeito do BSA e dos hormônios esteróides como suplementos do meio de cultura.*

O soro bovino é composto por uma mistura complexa de substâncias, tais como hormônios protéicos e esteróides, peptídeos, vitaminas, amino-ácidos, fatores de crescimento, substratos energéticos, dentre várias outras. Com o intuito de se abolir tais variáveis do ambiente de cultura para melhor se analisar o efeito dos hormônios esteróides sobre o processo maturacional de oócitos bovinos, realizou-se nova série de experimentos onde se aboliu o soro bovino do meio de cultura, suplementando-o com BSA como fonte protéica e adicionando doses conhecidas dos hormônios esteróides progesterona, testosterona e estradiol. O BSA foi escolhido por ser a segunda opção de fonte de macromoléculas pela maioria dos laboratórios que trabalha com produção *in vitro* de embriões bovinos.

Os COCs selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem e uma vez em meio de cultura, sendo então transferidos para a placa de cultura (média de 10 COCs por placa), cujo volume de meio de maturação foi padronizado em 3 ml.

O experimento foi dividido no seguinte protocolo:

#### *3.1 - Efeito dos esteróides*

- 1) Grupo controle (SFB): meio de maturação TCM199 (Gibco) suplementado com 10% de SFB, 22 µg/ml de piruvato, 50 µg/ml de gentamicina, 0,5 µg/ml de FSH e 50 µg/ml de LH.
- 2) Grupo controle (BSA): meio de maturação TCM199 suplementado com 0,6% de BSA como suplemento protéico (Sigma), 22 µg/ml de piruvato, 50 µg/ml de gentamicina, 0,5 µg/ml de FSH e 50 µg/ml de LH.
- 3) Grupo Progesterona: meio de maturação TCM199 suplementado com 0,6% de BSA (Sigma), 22 µg/ml de piruvato, 50 µg/ml de gentamicina, 0,5 µg/ml de FSH e 50 µg/ml de LH e progesterona nas concentrações de 1,0 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5,0 µg/ml ou 10,0 µg/ml.
- 4) Grupo Testosterona: meio de maturação TCM199 suplementado com 0,6% de BSA (Sigma), 22 µg/ml de piruvato, 50 µg/ml de gentamicina, 0,5 µg/ml de FSH e 50

µg/ml de LH e testosterona nas concentrações de 1,0 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5,0 µg/ml ou 10,0 µg/ml.

5) Grupo Estradiol: meio de maturação TCM199 suplementado com 0,6% de BSA (Sigma), 22 µg/ml de piruvato, 50 µg/ml de gentamicina, 0,5 µg/ml de FSH e 50 µg/ml de LH e estradiol nas concentrações de 1,0 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5,0 µg/ml ou 10,0 µg/ml.

### *3.2 - Efeito do tempo de cultura*

Para se analisar o efeito dos esteróides na maturação nuclear de oócitos bovinos, foi conduzida uma análise da cinética da maturação. As fases da maturação (Stock et al., 1997) que puderam ser observadas foram: fase de vesícula germinativa (GV) quando o oócito imaturo apresenta os cromossomos descondensados (tempo 0 horas de cultura), fase de Metáfase I (M I) quando os oócitos estão maximamente condensados numa estrutura semelhante a um cacho de uvas (tempo 8 horas de cultura), fase de Anáfase I (A I) e fase de Telófase I (T I) quando aparecem dois grupos iguais de cromossomos condensados (tempo 16 horas de cultura) e fase de Metáfase II (M II) quando os cromossomos do oócito estão contraídos e os cromossomos do corpúsculo polar estão menores e altamente fluorescentes (tempo 24 horas de cultura).

O número de repetições (n) para o grupo SFB nos tempos 8, 16 e 24 horas foi, respectivamente, 5 (total de 37 COCs), 5 (85) e 5 (35). Para o grupo BSA foi 5 (31), 5 (76) e 5 (64). Para o grupo progesterona na concentração de 1 µg/ml foi 5 (49), 5 (67) e 5 (49); na concentração de 2,5 µg/ml foi de 5 (25), 5 (64) e 6 (51); na concentração de 5,0 µg/ml foi de 5 (29), 5 (61) e 6 (41); na concentração de 10,0 µg/ml foi de 4 (11), 5 (48) e 5 (35). Para o grupo testosterona na concentração de 1,0 µg/ml foi de 5 (19), 5 (63) e 5 (46); na concentração de 2,5 µg/ml foi de 4, 5 (65) e 5 (56); na concentração de 5,0 µg/ml foi de 5, 5 (51) e 5 (53); na concentração de 10,0 µg/ml foi de 5, 5 (51) e 5 (55). Para o estradiol na concentração de 1,0 µg/ml foi de 5 (46), 5 (48) e 5 (55); na concentração de 2,5 µg/ml foi de 5 (48), 5 (59) e 5 (58); na concentração de 5,0 µg/ml foi de 5 (26), 6 (58) e 5 (68); na concentração de 10,0 µg/ml foi de 5 (17), 5 (47) e 5 (40).

Os oócitos foram incubados a 38,5°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> em ar, durante 8, 16 ou 24 horas. Ao término de cada período, os oócitos foram desnudos mecanicamente por vortexing durante 4 minutos em PBS. Para visualização dos cromossomos sob microscópio equipado com epifluorescência e filtro ultra-violeta, os oócitos foram montados em lâminas sobre gel preparado com Mowiol e 0,2% de solução corante Hoescht (0,1% de *bis*-benzamida, Hoescht n° 33342).

A taxa de oócitos nas diversas fases do estágio de maturação nuclear referiu-se a todos os oócitos que atingiram a determinada fase de maturação nuclear em relação ao total de oócitos colocados em cultura.

No momento em que as placas foram postas na estufa (tempo zero de cultura) e ao final da maturação (8, 16 ou 24 horas), foi retirado 1 ml de meio de cada placa, sendo estocado em freezer (-20°C) para posterior dosagem dos hormônios esteróides. Determinação dos níveis de esteróides no meio de cultura para maturação *in vitro* por Radioimunoensaio.

#### *4 - Radioimunoensaio*

Foram determinadas as concentrações de progesterona, testosterona e estradiol no meio de maturação *in vitro*. As amostras foram colhidas no tempo zero (0), 6, 12 e 24 horas de cultura para os experimentos de suplementação do meio de cultura com soro bovino e no tempo zero (0), 8, 16 e 24 horas de cultura para os experimentos de suplementação do meio de cultura com BSA e esteróides.

##### *4.1 - Progesterona*

O método do duplo anticorpo descrito inicialmente para hormônios protéicos por Midgley et al. (1969) e modificado por Bélanger et al. (1980) foi utilizado para dosagem de progesterona por radioimunoensaio (RIE). A padronização de técnica de RIE para dosagem de progesterona no laboratório de Fisiologia da Reprodução - FMRP - USP foi descrita por Rosa-E-Silva et al. (1993).

Os reagentes e soluções utilizados foram:

- 1- Anticorpo antiprogesterona lote 169/10409 obtido pela sensibilização de coelhos inoculados com progesterona, gentilmente cedido pelo Dr. Bélanger, CHUL, Quebec, Canadá, sendo utilizado no ensaio a uma diluição entre 1/30.000 a 1/40.000.
- 2- Anticorpo antigamaglobulina de coelho desenvolvido no Laboratório de Fisiologia da Reprodução, Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, através de sensibilização em cabras.
- 3- Progesterona padrão do ensaio Sigma (P3297).
- 4- Tampão para marcação e para o RIE (TRIA): tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1M, pH 7,5, gelatina 0,1%,  $\text{NaN}_3$  0,1%,  $\text{NaCl}$  0,15M).
- 5- Tampão para diluição do primeiro anticorpo: tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1M, pH 7,5, gelatina 0,1%,  $\text{NaN}_3$  0,1%,  $\text{NaCl}$  0,15M). Soro de coelho normal 1% .
- 6- Progesterona para marcação (derivado L-tirosina da progesterona): Progesterona CMO-TME.
- 7-  $\text{Na}[^{125}\text{I}]$  cat IMS-30, Amersham International plc Inglaterra, HP79NA.
- 8- Sephadex-G25 stock G25-80, 20 a 80  $\mu$ , Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA.

O procedimento do RIE é descrito a seguir: 500  $\mu\text{l}$  de tampão fosfato contendo concentrações crescentes do esteróide padrão ou 400  $\mu\text{l}$  de tampão mais 100  $\mu\text{l}$  do meio de cultura desconhecido foram incubados com 200  $\mu\text{l}$  da solução de anticorpo, 100  $\mu\text{l}$  de progesterona  $^{125}\text{I}$  (20.000 cpm) e 250  $\mu\text{l}$  do segundo anticorpo diluído em tampão fosfato. A incubação a 4°C foi realizada durante 18 horas, após o que seguiu-se a centrifugação a 2000 rpm durante 15 minutos. A radioatividade do hormônio ligado ao anticorpo foi contada em um contador gama LBK com 70% de eficiência.

Para radioiodação, utilizou-se o método de cloramina-T descrito por Greenwood & Hunter (1963). Em 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  dos derivados TME da progesterona, adicionou-se 25  $\mu\text{l}$  do tampão do ensaio, 1 mCi de  $^{125}\text{I}$  e 25  $\mu\text{l}$  de cloramina-T (1 mg/ml). O tempo de oxidação foi de 2 minutos a temperatura ambiente e a reação foi parada com 25  $\mu\text{l}$  de metabissulfito de sódio (25 mg/ml), sendo utilizado 200  $\mu\text{l}$  de tampão do ensaio, posteriormente depositado na coluna. O  $^{125}\text{I}$  livre é eluído nas primeiras frações seguido do hormônio marcado quando a eluição é realizada em uma velocidade de 8 gotas/minuto com tampão fosfato 0,01M, 1% gel, pH 6,0 e a colheita de 30 gotas/tubo.

O tubo que contém maior concentração de hormônio marcado é diluído em TRIA a 200.000 cpm/100 µl, estocado a 4°C e utilizado por até 3 meses.

A coluna foi feita com uma pipeta de 10 ml cortada, siliconizada e preenchida com Sephadex G25 Fine. O gel foi colocado para inflar em água destilada 48 horas antes da elaboração da coluna e passou por um processo de deaeração com uma bomba a vácuo por aproximadamente 24 horas.

Em seguida, depositou-se o gel lentamente na coluna a fim de se evitar a formação de bolhas. A coluna foi equilibrada com o tampão no mínimo 1 hora antes da marcação.

Os padrões de progesterona foram diluídos a uma concentração de 1 mg/ml de etanol (solução mãe), sendo conservados em freezer a -20°C.

A especificidade do anticorpo não foi determinada no laboratório por ser um anticorpo bem caracterizado pelo laboratório de origem. A porcentagem de reação cruzada com outros esteróides foi menor do que 0,1% com pregnenolona, androstenediona, testosterona, diidrotestosterona (DHT), 3,diol diidroepiandrosterona (DHEA), estradiol e estrona e 100% com a própria progesterona (Bélanger et al., 1980). Quando se analisou a concentração do primeiro anticorpo no ensaio, verificou-se que os títulos 1:12.000, 1:20.000 e 1:30.000, corresponderam a valores de imunoreatividade (Bo/T ligado na concentração zero de progesterona / total radioatividade colocado por tubo de RIE) de 54%, 39% e 25%, respectivamente. Foi adotado o título de 1:30.000 por apresentar B/Bo médio de 26%, com uma variação de 24% a 29%.

Utilizando-se 20.000 cpm de progesterona <sup>125</sup>I, primeiro anticorpo a 1:30.000 e segundo anticorpo cuja diluição variou de acordo com o lote utilizado, observou-se que a contagem não específica foi em média de 4,14%, variando de 3,0 a 6,0%. A concentração do padrão variou de 6,25 a 5.000 pg, sendo que a média da dose mínima detectável foi menor que 6,25 pg/tubo. A média da dose observada quando B/Bo é igual a 50% foi de 76,5 pg/tubo com coeficiente de variação ou erro interensaio de 10,3%. Os erros intraensaio foram em média de: 7,9%, 3,4% e 3,6% (média de 4,96%) a nível de 30, 50 e 80% (B/Bo%).

#### 4.2 - Testosterona

O RIE para testosterona foi baseado no método descrito por Bélanger et al., (1980), padronizado no laboratório de Fisiologia da Reprodução - FMRP - USP por Rosa-E-Silva et al. (1993).

Os reagentes e soluções utilizados foram:

- 1- Antigamaglobulina de coelho produzido em cabras, fornecido pelo Prof. Dr. José Antunes Rodrigues, FMRP-USP, Ribeirão Preto, SP.
- 2- Anticorpo antitestosterona desenvolvido em coelhos imunizados com testosterona 7 $\alpha$ -butirato-BSA, gentilmente cedido pelo Dr. Bélanger, CHUL, Quebec, Canadá.
- 3- Na[<sup>125</sup>I] cat IMS-30, Amersham International plc, Inglaterra, HP79NA, gentilmente cedido pelo Dr. Bélanger, CHUL, Quebec, Canadá.
- 4- Sephadex-G25 stock número G25-80, 20-80  $\mu$ , Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA.
- 5- Tampão para marcação e para o RIE (TRIA): tampão fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M, pH 7,5, gelatina 0,1%, NaN<sub>3</sub> 0,1%, NaCl 0,15M).
- 6- Tampão diluição do primeiro anticorpo: tampão fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M, pH 7,5, gelatina 0,1%, NaN<sub>3</sub> 0,1%, NaCl 0,15M). Soro de coelho normal 1%.
- 7- Testosterona para marcação - derivado tirosina metil éster (TME), testosterona 7 $\alpha$ -butirato.
- 8- Testosterona utilizada como padrão fornecida pela Sigma (T1268).

O procedimento do RIE é descrito a seguir: 500  $\mu$ l de TRIA contendo concentrações crescentes de esteróide padrão ou 250  $\mu$ l de tampão mais 250  $\mu$ l de meio de cultura foram incubados com 200  $\mu$ l da solução de anticorpo, 100  $\mu$ l da testosterona marcada (20.000 cpm) e 250  $\mu$ l do segundo anticorpo diluído em TRIA. A incubação a 4°C foi realizada durante 18 horas após o que seguiu-se a centrifugação a 2000 rpm durante 15 minutos. A radioatividade do hormônio ligado ao anticorpo foi contada em um contador gama LKB com 70% de eficiência..

Para radioiodação da testosterona utilizamos o método da cloramina-T (Greenwood & Hunter, 1963) modificado por Bélanger (1980). O derivado L-tirosina da testosterona foi usado para marcação: 1  $\mu$ g do derivado diluído em 10  $\mu$ l de etanol foi misturado em 25  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5M, pH 7,5) e em 1 mCi Na[I<sup>125</sup>]. Vinte e

cinco µl de uma solução de cloramina-T (1mg dissolvido em 1 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05M, pH 7,6) foram adicionados à reação, que foi interrompida após 2 minutos a temperatura ambiente com a adição de 25 µl de metabissulfito de sódio (2 mg/ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5M, pH 7,5). A mistura foi imediatamente transferida para a coluna de Sephadex G25 (10 cm x 1 cm) e eluída com TRIA. O <sup>125</sup>I livre é eluído nas primeiras frações seguido do hormônio marcado (tubos 10-15), quando a eluição é feita numa velocidade de 8 gotas/minuto e a coleta de 30 gotas/tubo. O tubo no qual a concentração do hormônio marcado é máxima (pico) é diluído em TRIA a 200.000 cpm/100 µl, estocado a 4°C e utilizado por até 3 meses.

Quando se analisou a concentração do primeiro anticorpo, verificou-se que os títulos 1:6.250, 1:15.625, 1:31.250, 1:62.500, 1:125.000, 1:875.000, 1:250.000, 1:312.500, 1:625.000, 1:1.250.000, 1:3.125.000, correspondem a valores de Bo/T (ligação máxima/total traçador) que são 89%, 86%, 77%, 58%, 51%, 43%, 40%, 24%, 18%, e 4%, respectivamente. Foi adotado o título 1:250.000 por apresentar valor B/Bo entre 40% e 50%. O segundo anticorpo foi testado e sua diluição variou de acordo com o lote utilizado. A especificidade do anticorpo não foi determinada em nosso laboratório por ser um anticorpo bem caracterizado pelo laboratório de origem. A porcentagem de reação cruzada que apresenta com outros esteróides é menor do que 0,1% com a pregnenolona, progesterona, 17-hidroxiprogesterona, DHEA, estradiol e estrona; 0,5% com a androstenediona; 21% com DHT e 100% com a própria testosterona.

Utilizando-se 20.000 cpm de testosterona <sup>125</sup>I e o primeiro anticorpo a 1:250.000, observou-se que a contagem não específica foi em média de 3,63%, variando de 3,0 a 4,0%, com um coeficiente de variação de 10,02%. A concentração do padrão variou de 6.25 a 5.000 pg/tubo, sendo a média da dose mínima detectável de 13,65 pg/tubo. A média da dose observada quando B/Bo é igual a 50% foi de 159,4 pg/tubo com coeficiente de variação ou erro interensaio de 13,5%. Os erros intraensaio foram em média de 5,3%, 7,1% e 4,25% a nível de 25, 100 e 1.000 pg/tubo.

### 4.3 - Estradiol

Para o RIE de estradiol, utilizou-se o método descrito por Bélanger et al. (1980).

Os reagentes e soluções utilizados foram:

- 1- Estradiol Amersham ([2,4,6,7<sup>3</sup>H] oestradiol), 10  $\mu$ Ci/mol em cada partilha.
- 2- Carvão ativado Mallinbrodt, produto número 4394.
- 3- Dextrana Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA, produto ND4751.
- 4- Líquido de cintilação: PPO Merck artigo 2946 (5g), tolueno Merck artigo 8325 (980 ml) e metanol absoluto Merck artigo 6009 (20 ml).
- 5- Tampão para o RIE (TRIA): tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1M, pH 7,5, gelatina 0,1%,  $\text{NaN}_3$  0,1%,  $\text{NaCl}$  0,15M).
- 6- Estradiol padrão Sigma produto E8875 ( $\beta$ -estradiol: (1,3,5[10]-Estratriene-3,17 $\beta$ -diol), lote 10H0065. Os padrões de estradiol foram diluídos a uma concentração de 1 mg/ml de etanol (solução mãe) e conservados em freezer a  $-20^\circ\text{C}$ . A concentração de estradiol padrão variou entre 0,5 a 500 pg/tubo.
- 7- Anticorpo anti-estradiol cedido pelo Dr. Bélanger, CHUL, Quebec, Canadá, utilizado no ensaio a uma diluição de 1:80.000.

Quinhentos  $\mu$ l de tampão fosfato contendo concentrações crescentes do esteróide padrão ou 475  $\mu$ l de tampão mais 25  $\mu$ l do meio de cultura foram incubados com 200  $\mu$ l da solução de anticorpo e 100  $\mu$ l de estradiol <sup>3</sup>H. A incubação a 4°C foi realizada durante 18 horas, após o que adicionou-se 250  $\mu$ l da mistura de carvão 0,125% e dextrana 0,00125%. Seguiu-se a centrifugação a 2000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi vertido em tubos de cintilação, ao qual foi adicionado 5 ml de líquido de cintilação. Após agitação, os tubos foram lidos em um cintilador líquido Beckman.

A especificidade do anticorpo não foi determinada no laboratório por ser um anticorpo bem caracterizado pelo laboratório de origem. A percentagem de reação cruzada apresentada com outros esteróides foi menor do que 0,1% com pregnenolona, progesterona, 17-hidroxiprogesterona, androstenediona, testosterona, DHT, DHEA, estrona e 100% com o próprio estradiol.

A percentagem de ligação específica foi de 29%. A dose mínima detectável foi de 1,30 pg/ml. Quando B/Bo foi de 50%, a dose média observada foi de 20,0 pg/ml. O erro intraensaio foi de 3,10% e o erro interensaio foi de 5,83%.

## 5 - Análise estatística

Para avaliar-se o efeito das diferentes suplementações séricas ou da suplementação com BSA e hormônios esteróides do meio de cultura sobre a MIV, os dados foram analisados pela fração de oócitos cultivados atingindo os estágios determinados, reportados em termos de porcentagem. A taxa de maturação foi calculada pela fração do número total de oócitos cultivados sobre o número total de oócitos atingindo as fases de M I, A I e T I, M II ou imaturos em fase de GV (%). Os dados em porcentagem foram transformados em  $\text{arc sen } \sqrt{x+0,00}$ , aplicando-se análise de variância para verificar se existiu diferença entre as suplementações e, posteriormente, aplicando-se o teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 0,05.

Para verificar-se a variação dos níveis de esteróides no meio de cultura, foi aplicada análise de Regressão Polinomial, com o respectivo teste de significância (F) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Aplicou-se o teste de Tukey para verificação de diferenças entre as diversas suplementações séricas ( $p < 0,05$ ). Os resultados são apresentados na forma de média dos resultados  $\pm$  SEM.

Os valores obtidos dos níveis de progesterona, testosterona e estradiol no meio de cultura suplementado com BSA e esteróides, foram transformados em  $\log(x+1)$  e comparados por meio de análise de variância para se verificar diferenças entre hormônios, tempo e existência de interação hormônio x tempo. A comparação entre as médias dos hormônios em cada tempo de cultura foi efetuada utilizando-se o método de Tukey. O nível de significância adotado foi de 0,05. A análise estatística foi efetuada empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System).

## **Resultados**

---

*1 – Maturação in vitro de oócitos bovinos cultivados em meio de cultura suplementado com soro de vaca nas várias fases do ciclo estral.*

A adição de soro de vaca ao meio de cultura para maturação *in vitro* não influenciou a taxa de oócitos bovinos que concluíram a maturação nuclear (atingiram M II), uma vez que não houve diferença estatística entre os grupos suplementados com soro de vaca e os grupos controle (Tabela 1). Entretanto, ao se analisar entre si apenas os grupos suplementados com soro de vaca, verifica-se que a menor taxa de maturação ocorreu quando oócitos foram maturados na presença de SFB+SVP (74,46% de oócitos atingindo M II) e que esta diferença foi significativa ( $p < 0,05$ ) ao se comparar com a maior taxa de maturação (97,14%) que ocorreu quando os oócitos foram maturados na presença de SFB+SVE como suplemento do meio de maturação. Porém, ambos os grupos não diferiram do grupo suplementado com SFB+SVM (95,16%). Não se verificou diferença entre os grupos com relação à porcentagem de oócitos não maturados ou degenerados.

Assim sendo, parece que além do soro fetal bovino, a adição de soro de vaca ao meio de cultura para MIV melhora o ambiente no qual ocorre a maturação, onde há uma tendência de um número maior de oócitos completarem a divisão meiótica.

Tabela 1 - Efeito de diversas suplementações séricas do meio de cultura sobre a maturação *in vitro* de oócitos bovinos

Suplementação	Maturação		
	Maturados (%)	Não maturados (%)	Degenerados (%)
SS	89,00 <sup>ab</sup>	9,00 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup>
SFB	90,10 <sup>ab</sup>	8,36 <sup>a</sup>	1,54 <sup>a</sup>
SFB+SVP	74,46 <sup>a</sup>	13,38 <sup>a</sup>	12,16 <sup>a</sup>
SFB+SVE	97,14 <sup>b</sup>	0,00 <sup>a</sup>	2,86 <sup>a</sup>
SFB+SVM	95,16 <sup>ab</sup>	1,56 <sup>a</sup>	3,28 <sup>a</sup>

<sup>ab</sup> Letras diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

## *2 – Concentração de hormônios esteróides no meio de cultura para maturação in vitro suplementado com soro de vaca nas várias fases do ciclo estral.*

Para determinação dos níveis de hormônios esteróides adicionados ao meio de maturação pela suplementação com soro bovino e ainda da capacidade de síntese e/ou secreção de hormônios esteróides pelas células da granulosa presentes na cultura durante a MIV, o meio de cultura foi analisado quanto suas concentrações de progesterona, testosterona e estradiol. Os esteróides foram dosados por RIE de amostras de meio colhidas no início da maturação (tempo 0 horas) e após 6, 12 e 24 horas de cultura.

Os resultados demonstraram que na ausência de suplementação sérica, as células da granulosa foram incapazes de secretar progesterona durante as 24 horas de cultura. Quando o meio recebeu soro bovino como suplemento, as células da granulosa tornaram-se hábeis em secretar a progesterona (significativo pela análise de regressão polinomial) e os níveis produzidos variaram dependentemente do soro adicionado à cultura (Tabela 2). Os níveis de progesterona mantiveram-se inalterados até as 12 horas de cultura para todos os grupos suplementados com soro, quando então verificou-se uma elevação súbita no final da cultura, demonstrando claramente que estas células sofreram um processo de luteinização após 12 horas de cultura. Os resultados podem ser melhor visualizados observando-se a Figura 1.

Não houve variação dos níveis de testosterona durante as 24 horas de cultura (análise de regressão polinomial), uma vez que não haviam células da teca na cultura, as quais são as responsáveis pela produção de testosterona no ovário (Tabela 3). Entretanto, os resultados demonstraram que o soro bovino adicionado ao meio de cultura como suplemento forneceu a testosterona que foi posteriormente utilizada como precursora para aromatização em estradiol. No grupo SS, os níveis de testosterona permaneceram extremamente baixos (concentração média de 0,018 ng/ml). Os níveis de testosterona variaram dependendo do soro bovino adicionado ao meio, sendo que a maior concentração verificada foi quando o meio foi suplementado com SFB+SVE (concentração média de 0,6 ng/ml). Os resultados podem ser melhor visualizados observando-se a Figura 2.

Com relação ao estradiol, verificou-se um aumento gradual da sua concentração logo após 6 horas de cultura e que se estendeu até as 24 horas de cultura para todos os grupos onde houve suplementação com soro bovino (Tabela 4). Entretanto, a variação dos níveis deste hormônio durante as 24 horas de maturação só foi significativa para os grupos SFB+SVP e SFB+SVM (análise de regressão polinomial). Novamente verificou-se que as células da granulosa não se demonstraram hábeis em secretar esteróide na ausência de soro bovino, o qual parece estimular a esteroidogênese destas células ao lhes fornecer precusores e/ou outros fatores estimulatórios. Por outro lado, quando o meio de cultura foi suplementado com soro bovino, as células da granulosa passaram a secretar estradiol. Os resultados podem ser melhor visualizados observando-se a Figura 3.

Tabela 2 - Níveis médios de progesterona (ng/ml) no meio de cultura para maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Análise de regressão polinomial.

Horas de Cultura	Suplementação				
	SS	SFB	SFB+SVP	SFB+SVE	SFB+SVM
0	1,06	2,53	1,74	1,80	3,53
6	1,43	6,51	3,62	2,10	2,81
12	1,10	9,54	9,58	3,90	5,00
24	1,93	34,84	120,76	34,27	74,63
F	1,14 <sup>ns</sup>	27,80 <sup>**</sup>	45,07 <sup>**</sup>	5,28 <sup>*</sup>	9,65 <sup>**</sup>
R <sup>2</sup>		0,91	0,99	0,99	0,99
Regressão		1º grau	2º grau	2º grau	2º grau

<sup>ns</sup> não significativo (p>0,05)

<sup>\*</sup> significativo (p<0,05)

<sup>\*\*</sup> significativo (p<0,01)

Tabela 3 - Níveis médios de testosterona (ng/ml) no meio de cultura para maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Análise de regressão polinomial.

Horas de Cultura	Suplementação				
	SS	SFB	SFB+SVP	SFB+SVE	SFB+SVM
0	0,0018	0,195	0,303	0,634	0,278
6	0,0018	0,132	0,232	0,546	0,316
12	0,0023	0,118	0,233	0,663	0,228
24	0,0014	0,137	0,244	0,632	0,294
F	0,8335 <sup>ns</sup>	1,1516 <sup>ns</sup>	0,9344 <sup>ns</sup>	0,1951 <sup>ns</sup>	1,5782 <sup>ns</sup>

<sup>ns</sup> não significativo ( $p > 0,05$ )

Tabela 4 - Níveis médios de estradiol (ng/ml) no meio de cultura para maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Análise de regressão polinomial.

Horas de Cultura	Suplementação				
	SS	SFB	SFB+SVP	SFB+SVE	SFB+SVM
0	0,36	33,03	7,25	24,07	2,13
6	0,76	35,67	26,69	29,80	5,25
12	0,87	38,60	27,14	41,52	5,69
24	0,91	58,10	36,51	38,93	9,31
F	1,73 <sup>ns</sup>	1,39 <sup>ns</sup>	23,04 <sup>**</sup>	0,69 <sup>ns</sup>	19,85 <sup>**</sup>
R <sup>2</sup>			0,79		0,95
Regressão			1º grau		1º grau

<sup>ns</sup> não significativo (p>0,05)

<sup>\*\*</sup> significativo (p<0,01)

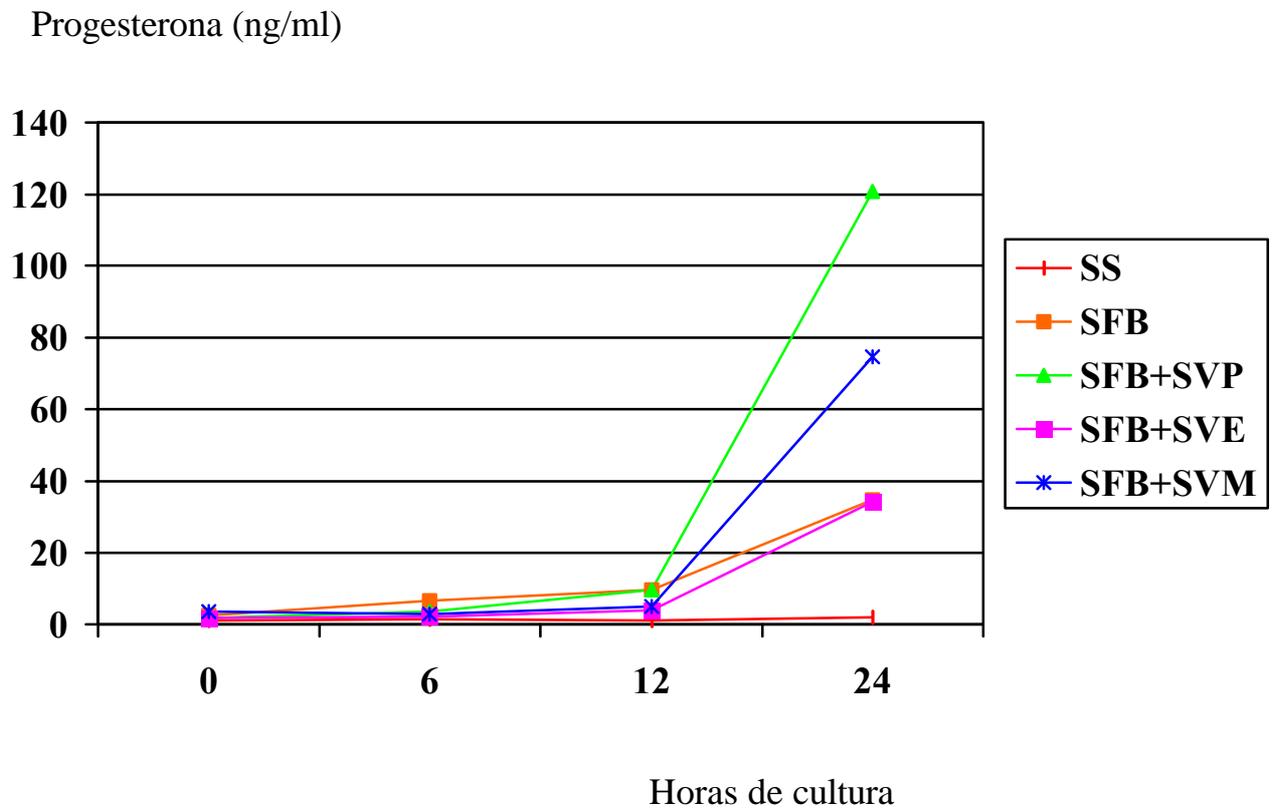


Figura 1 - Níveis de progesterona (ng/ml) no meio de cultura para maturação *in vitro* de oócitos bovinos suplementado com soro de vaca nas diversas fases do ciclo estral.

Testosterona (ng/ml)

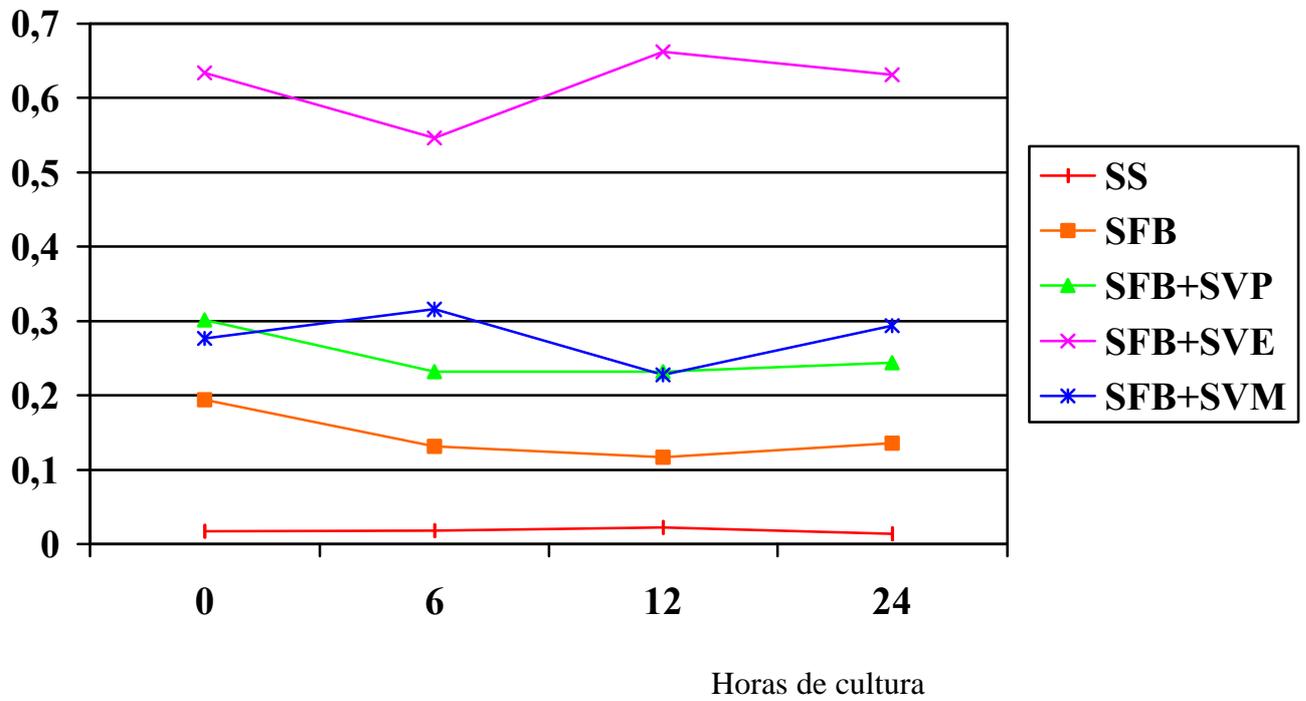


Figura 2 - Níveis de testosterona (ng/ml) no meio de cultura para maturação *in vitro* de oócitos bovinos suplementado com soro de vaca nas diversas fases do ciclo estral.

Estradiol (ng/ml)

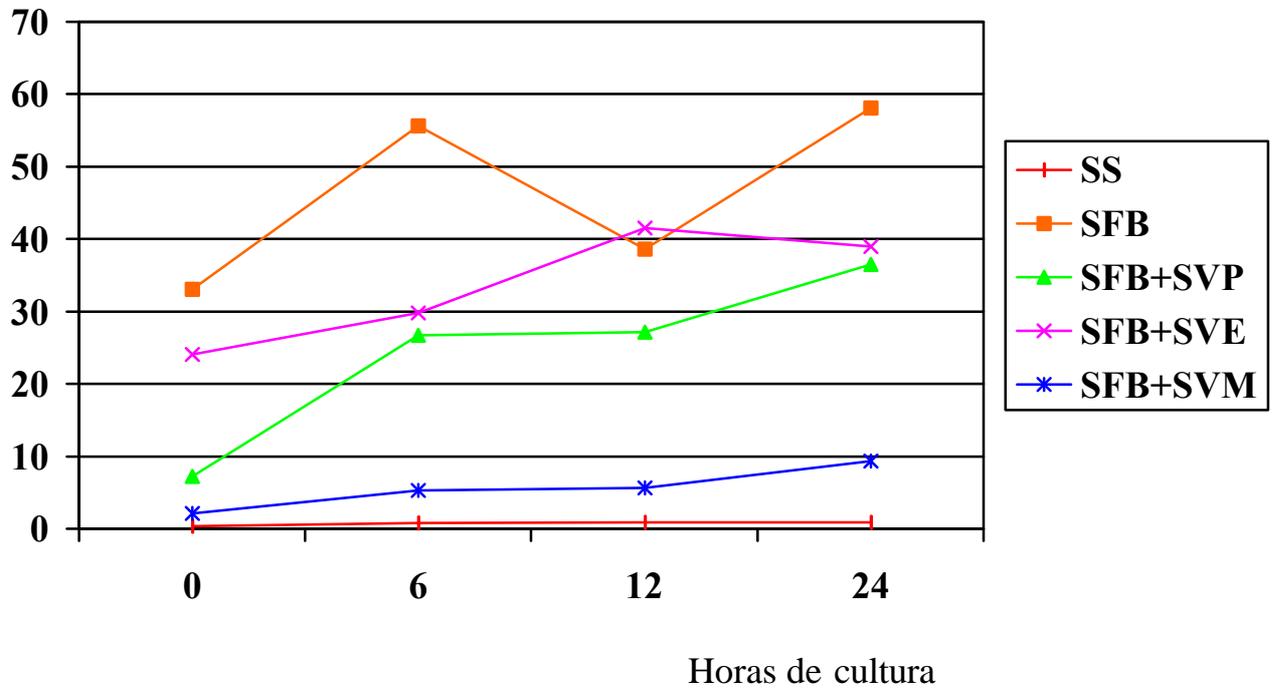


Figura 3 - Níveis de estradiol (ng/ml) no meio de cultura para maturação *in vitro* de oócitos bovinos suplementado com soro de vaca nas diversas fases do ciclo estral.

Para se verificar se houve diferença entre os níveis de esteróides para os grupos, foi aplicada análise de variância (teste de Tukey). Não se verificou diferença entre os níveis de progesterona no meio de cultura suplementado com vários soros bovinos, no início da cultura (Tabela 5). Após seis horas de cultura se observou uma pequena elevação dos níveis de progesterona no grupo SFB, que diferiu dos outros grupos ( $p < 0,05$ ). Após 12 horas de cultura, houve nova elevação dos níveis de progesterona em todos os grupos suplementados com soro bovino ( $p < 0,05$ ), mas conforme citado anteriormente, a maior produção ocorreu no final da cultura, quando se observou os maiores níveis deste esteróide nos grupos SFB+SVE e SFB+SVM.

Apesar de não se ter observado variação dos níveis de testosterona no meio durante o decorrer da cultura, notou-se diferença entre os grupos para cada tempo de cultura, devido à adição deste esteróide ao meio pelo soro sanguíneo adicionado (Tabela 6). Assim sendo, observou-se concentrações extremamente baixas de testosterona no meio SS ( $p < 0,05$ ), mais elevadas no meio SFB+SVE ( $p < 0,05$ ) e intermediárias nos grupos SFB, SFB+SVP, SFB+SVM (não diferem entre si pelo teste de Tukey).

Se observou diferença nos níveis de estradiol entre os grupos logo no início da cultura (Tabela 7), pois a suplementação com SFB e SFB+SVE forneceu elevadas concentrações deste esteróide ao meio ( $p < 0,05$ ). Muito embora nestes grupos a concentração inicial de estradiol tenha sido elevada, não houve produção adicional deste hormônio durante o decorrer da cultura, como anteriormente citado (Tabela 4). A suplementação do meio de cultura com SFB+SVP e SFB+SVM estimulou a produção de estradiol, que estava baixa no início da cultura (Tabela 4). Ao final da cultura, os níveis de estradiol dos grupos SFB, SFB+SVP e SFB+SVE diferiram dos grupos SS e SFB+SVM ( $p < 0,05$ ).

Tabela 5 - Média e erro padrão da média dos níveis de progesterona (ng/ml) no meio de cultura suplementado com vários soros, para cada hormônio e tempo de cultura

Hormônio	Tempo de Cultura			
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas
SS	1,06 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,43 ± 0,31 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,37 <sup>a</sup>	1,93 ± 0,56 <sup>a</sup>
SFB	2,53 ± 0,80 <sup>a</sup>	6,51 ± 0,90 <sup>b</sup>	9,54 ± 1,95 <sup>b</sup>	35,34 ± 7,92 <sup>ab</sup>
SFB+SVP	1,74 ± 0,15 <sup>a</sup>	3,62 ± 0,72 <sup>a</sup>	9,58 ± 2,87 <sup>b</sup>	120,76 ± 11,60 <sup>c</sup>
SFB+SVE	1,80 ± 0,51 <sup>a</sup>	2,10 ± 0,32 <sup>a</sup>	3,90 ± 0,72 <sup>ab</sup>	38,27 ± 6,59 <sup>ab</sup>
SFB+SVM	3,53 ± 1,08 <sup>a</sup>	2,81 ± 0,48 <sup>a</sup>	5,00 ± 0,86 <sup>ab</sup>	74,63 ± 17,29 <sup>bc</sup>

<sup>abc</sup> Letras diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Tabela 6 - Média e erro padrão da média dos níveis de testosterona (ng/ml) no meio de cultura suplementado com vários soros, para cada hormônio e tempo de cultura

Hormônio	Tempo de Cultura			
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas
SS	0,017 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,018 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,022 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,014 ± 0,004 <sup>a</sup>
SFB	0,194 ± 0,052 <sup>ab</sup>	0,132 ± 0,024 <sup>ab</sup>	0,118 ± 0,020 <sup>ab</sup>	0,136 ± 0,016 <sup>ab</sup>
SFB+SVP	0,302 ± 0,044 <sup>b</sup>	0,232 ± 0,043 <sup>ab</sup>	0,232 ± 0,015 <sup>b</sup>	0,244 ± 0,017 <sup>ab</sup>
SFB+SVE	0,634 ± 0,126 <sup>c</sup>	0,546 ± 0,105 <sup>c</sup>	0,662 ± 0,070 <sup>c</sup>	0,631 ± 0,121 <sup>c</sup>
SFB+SVM	0,277 ± 0,040 <sup>ab</sup>	0,316 ± 0,029 <sup>bc</sup>	0,229 ± 0,009 <sup>b</sup>	0,294 ± 0,031 <sup>b</sup>

<sup>abc</sup> Letras diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Tabela 7 - Média e erro padrão da média dos níveis de estradiol (ng/ml) no meio de cultura suplementado com vários soros, para cada hormônio e tempo de cultura

Hormônio	Tempo de Cultura			
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas
SS	0,36 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,87 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,30 <sup>a</sup>
SFB	33,03 ± 10,32 <sup>b</sup>	55,67 ± 9,69 <sup>b</sup>	38,60 ± 13,80 <sup>b</sup>	58,10 ± 10,46 <sup>b</sup>
SFB+SVP	7,26 ± 1,71 <sup>ac</sup>	26,69 ± 2,94 <sup>c</sup>	27,14 ± 4,90 <sup>bc</sup>	36,51 ± 5,22 <sup>b</sup>
SFB+SVE	24,07 ± 7,08 <sup>bc</sup>	29,80 ± 8,16 <sup>c</sup>	41,52 ± 12,22 <sup>b</sup>	38,93 ± 10,97 <sup>b</sup>
SFB+SVM	2,13 ± 0,59 <sup>a</sup>	5,25 ± 1,12 <sup>a</sup>	5,69 ± 1,28 <sup>ac</sup>	9,31 ± 1,31 <sup>a</sup>

<sup>abc</sup> Letras diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Após o preparo do meio de cultura, foi retirada uma alíquota para dosagem de hormônios esteróides (meio sem células da granulosa) e após a adição das células da granulosa ao meio para co-cultivo com COCs, foi retirada outra alíquota (meio com células da granulosa), ambas as amostras sendo relativas ao tempo zero de cultura. Observou-se, em algumas situações, que imediatamente após a adição de células da granulosa houve elevação dos níveis de progesterona, testosterona e estradiol no meio de cultura (significativo ao nível de 5% pelo teste de Tukey). Este dado sugere a existência de um estoque intra-celular destes esteróides, que são liberados no meio de cultura, mesmo naquele meio que não recebeu suplementação sérica (dados não demonstrados).

Esta observação é importante no sentido de que, mesmo se havendo um esforço atual para o desenvolvimento de meios quimicamente definidos para produção *in vitro* de embriões bovinos, as células do *cumulus* dos COCs contaminam o meio com esteróides. Uma vez que os COCs são provenientes de folículos em estágios fisiológicos distintos, provavelmente os níveis intra-celulares de esteróides sejam diferentes, alterando a composição hormonal do meio de cultura.

### 3 – Maturação *in vitro* de oócitos bovinos cultivados em meio de cultura suplementado com BSA e hormônios esteróides em diferentes concentrações.

Com o objetivo de se analisar o efeito dos hormônios esteróides na maturação *in vitro* de oócitos bovinos, foi conduzida nova série de experimentos onde se aboliu o soro bovino do meio de cultura, substituindo-o pelo BSA como fonte de macromoléculas. Os hormônios esteróides (progesterona, testosterona e estradiol) foram adicionados ao meio em concentrações crescentes e conhecidas. Os oócitos foram fixados para análise da maturação nuclear após 8, 16 e 24 horas de cultura, quando se procurou respectivamente as fases de M I, T I e M II, mas também foi possível observar as fases de GV no início da cultura e de A I após 16 horas de cultura (Figura 4).

Quando os oócitos foram maturados em meio de cultura suplementado com progesterona em diversas concentrações, a porcentagem de oócitos que atingiu a fase de M I após 8 horas de cultura para os grupos SFB, BSA, progesterona 1,0 µg/ml, progesterona 2,5 µg/ml, progesterona 5,0 µg/ml e progesterona 10,0 µg/ml foi respectivamente: 86,88±6,24, 85,7±8,3, 82,9±4,4, 28,6±13,4 (\* difere dos grupos controle ao nível de 5% de probabilidade), 87,5±12,5, 51,8±23,2 (Tabela 8). A porcentagem de oócitos que atingiu a fase de T I após 16 horas de cultura (Tabela 9) foi respectivamente: 61,12±6,51, 65,6±4,6, 53,3±13,8, 27,4±11,2 (\*), 9,4±6,9 (\*), 9,6±6,7 (\*). A porcentagem de oócitos que atingiu a fase de M II após 24 horas de cultura foi respectivamente: 53,24±8,5, 57,7±10,4, 36,4±6,3, 25,4±1,8 (\*), 51,1±7,1, 49,3±8,7 (Tabela 10). Verificou-se que a progesterona exerceu um efeito inibitório na retomada da maturação nuclear *in vitro* de oócitos bovinos. Esta inibição foi muito evidente após 16 horas de cultura, quando os oócitos atingem a fase de TI, mas foi revertida após 24 horas de cultura, quando os oócitos atingem MII, exceto quando adicionada ao meio de cultura na concentração de 2,5 µg/ml. Neste caso, a progesterona foi potencialmente inibitória da maturação nuclear. Este experimento demonstrou que a presença de progesterona na cultura para MIV de oócitos bovinos causou inibição ou retardou a retomada da meiose em todas as concentrações estudadas, e inibiu a conclusão da

meiose concentração de 2,5 µg/ml. Os resultados podem ser melhor visualizados observando-se a Figura 5.

A testosterona exerceu um efeito prejudicial na maturação nuclear de oócitos bovinos. A porcentagem de oócitos que atingiu a fase de M I após 8 horas de cultivo foi respectivamente: 86,88±6,24, 85,72±8,25, 57,5±12,67, 63,23±8,27 , 59,29±9,30 , 73,35±15,20 (Tabela 11). A porcentagem de oócitos que atingiu a fase de T I (Tabela 12) após 16 horas de cultura foi: 61,12±6,51, 65,64±4,56, 41,3±10,93, 51,03±2,96, 49,05±2,8, 25,41±3,30 (\*). A porcentagem de oócitos que atingiu a fase de M II (Tabela 13) após 24 horas de cultura foi: 53,24±8,5, 57,71±10,37, 39,94±11,05, 37,79±13,37, 49,79±7,52, 25,27±6,65 (\*). A testosterona prejudicou a maturação nuclear em todas as concentrações utilizadas neste experimento, mas as piores taxas de maturação ocorreram quando se utilizou a concentração de 10,0 µg/ml. Os resultados podem ser melhor visualizados observando-se a Figura 6.

Quando se analisou o efeito do estradiol sobre a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, a porcentagem de oócitos que atingiu a fase de M I após 8 horas de cultura para os grupos foi respectivamente: 86,88±6,24, 85,7±8,3, 95,5±2,8, 89,1±8,6, 56,4±10,5, 90,3±5,0 (Tabela 14). A porcentagem de oócitos que atingiu a fase de T I (Tabela 15) após 16 horas de cultura foi respectivamente: 61,12±6,51, 65,6±4,6, 74,4±13,0, 60,6±9,3, 55,5±6,9, 44,1±14,5 (\*). A porcentagem de oócitos que atingiu a fase de MII após 24 horas de cultura foi respectivamente: 53,24±8,5, 57,7±10,4, 36,7±4,8, 46,2±8,2, 66,6±6,71, 40,8±16,4 (Tabela 16). Neste caso, apesar de não ter sido verificada diferença significativa entre os grupos controle e os demais, houve diferença entre o grupo suplementado com estradiol 1,0 µg/ml (menor % de MII) e o grupo suplementado com estradiol 5,0 µg/ml (maior % de MII). Este trabalho demonstrou que quanto maior a concentração de estradiol no meio de cultura, mais lento é o desenvolvimento inicial da maturação nuclear, porém uma maior porcentagem de oócitos atinge MII. Entretanto, parece que há um limite ótimo de operação do estradiol, pois este efeito é verificado até a concentração de 5,0 µg/ml, quando cai na maior concentração de 10,0 µg/ml. Os resultados podem ser melhor visualizados observando-se a Figura 7.

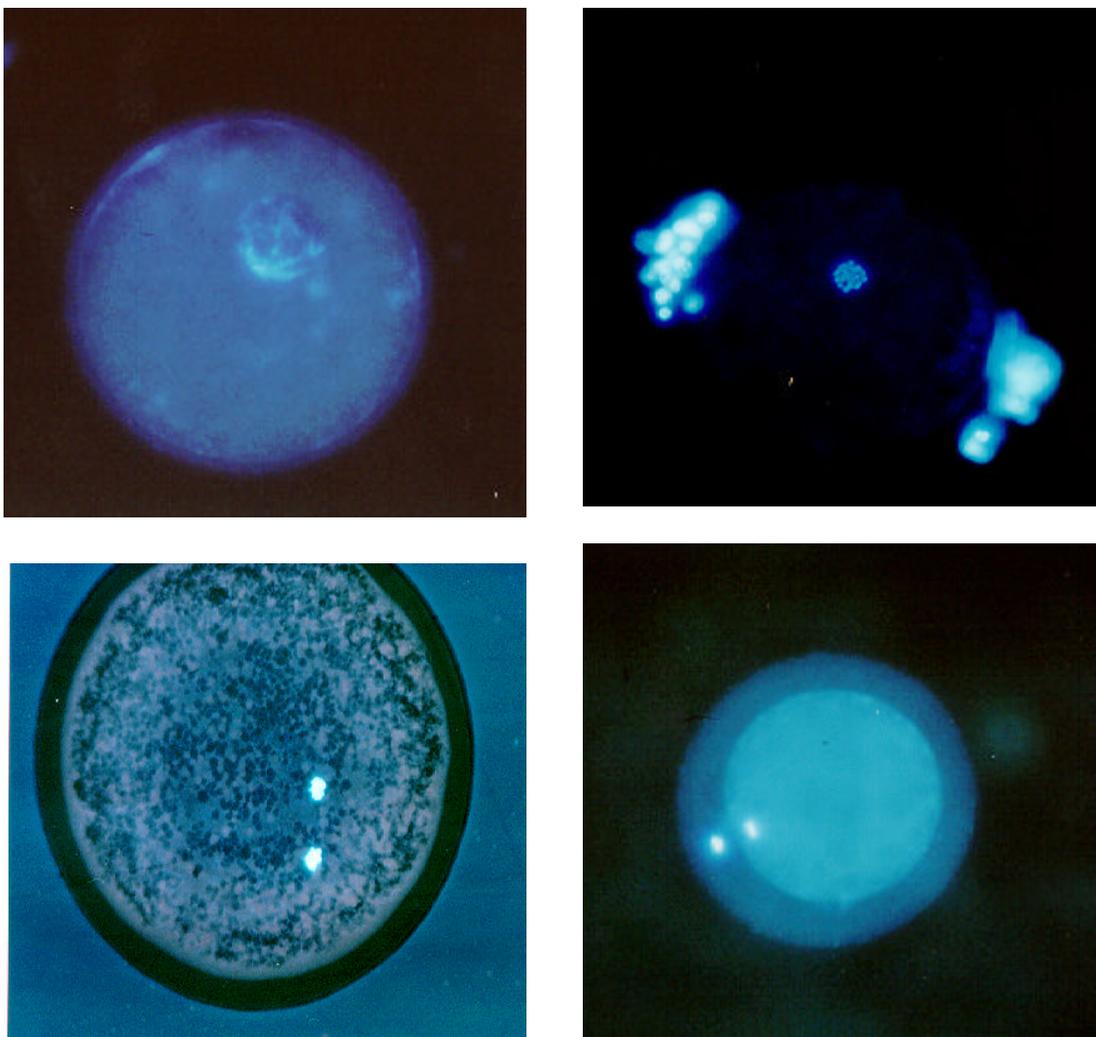


Figura 4 – Configuração cromossômica nos estágios de vesícula germinativa (a), metáfase I (b), telófase I (c) e metáfase II (d) em oócitos bovinos maturados *in vitro*. Coloração com Hoechst nº 33342. Aumento de 400 vezes.

Tabela 8 - Efeito da progesterona no processo de maturação *in vitro* em oócitos bovinos após 8 horas de cultivo

	GV	MI	AI	TI	MII
SFB	5,63±3,29 <sup>a</sup>	86,88±6,24 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
BSA	14,29±8,25 <sup>ab</sup>	85,72±8,25 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
P 1,0µg	5,64 ± 3,69 <sup>a</sup>	82,92±4,42 <sup>a</sup>	8,40±2,85 <sup>b</sup>	4,72±2,90 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
P 2,5µg	56,93±21,47 <sup>b</sup>	28,57±13,35 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
P 5,0µg	12,50±12,50 <sup>ab</sup>	87,50±12,50 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
P 10,0µg	21,43±21,43 <sup>ab</sup>	51,79±23,22 <sup>ab</sup>	7,15±7,14 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>

Os resultados são apresentados na forma de porcentagem das estruturas atingindo cada fase das etapas da maturação, sobre o total de oócitos maturados. Os dados são apresentados na tabela como a média das porcentagens±SEM.

<sup>ab</sup> Letras diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo t-test.

Tabela 9 - Efeito da progesterona no processo de maturação *in vitro* em oócitos bovinos após 16 horas de cultivo

	GV	MI	AI	TI	MII
SFB	10,53±3,07 <sup>a</sup>	21,66±4,61 <sup>ac</sup>	5,15±2,38 <sup>a</sup>	61,12±6,51 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
BSA	7,85±3,90 <sup>a</sup>	12,99±3,88 <sup>a</sup>	12,19±4,44 <sup>a</sup>	65,64±4,56 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
P 1,0µg	9,91±8,34 <sup>a</sup>	17,71±5,18 <sup>ad</sup>	9,52±2,74 <sup>a</sup>	53,33±13,82 <sup>ac</sup>	2,86±2,86 <sup>a</sup>
P 2,5µg	3,25±2,08 <sup>a</sup>	42,79±9,32 <sup>c</sup>	17,00±11,79 <sup>a</sup>	27,44±11,24 <sup>bc</sup>	1,67±1,67 <sup>a</sup>
P 5,0µg	14,53±6,01 <sup>a</sup>	48,45±14,19 <sup>bc</sup>	18,42±5,52 <sup>a</sup>	9,36±6,93 <sup>b</sup>	2,97±1,82 <sup>a</sup>
P 10,0µg	7,08±4,73 <sup>a</sup>	70,66±5,27 <sup>b</sup>	8,45±3,45 <sup>a</sup>	9,64±6,74 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>

Os resultados são apresentados na forma de porcentagem das estruturas atingindo cada fase das etapas da maturação, sobre o total de oócitos maturados. Os dados são apresentados na tabela como a média das porcentagens±SEM.

<sup>ab</sup> Letras diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo t-test.

Tabela 10- Efeito da progesterona no processo de maturação *in vitro* em oócitos bovinos após 24 horas de cultivo

	GV	MI	AI	TI	MII
SFB	7,41±7,41 <sup>a</sup>	39,35±12,01 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>ab</sup>	53,24±8,50 <sup>a</sup>
BSA	1,33±1,33 <sup>a</sup>	39,62±10,85 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	57,71±10,37 <sup>a</sup>
P 1,0µg	3,82±2,34 <sup>a</sup>	49,31±6,43 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	36,42±6,33 <sup>a</sup>
P 2,5µg	0,00±0,00 <sup>a</sup>	42,85±8,74 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	31,80±10,42 <sup>b</sup>	25,35±1,84 <sup>b</sup>
P 5,0µg	6,94±4,52 <sup>a</sup>	18,50±8,43 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	13,65±8,43 <sup>ab</sup>	51,12±7,07 <sup>a</sup>
P 10,0µg	5,00±5,00 <sup>a</sup>	21,60±4,70 <sup>b</sup>	4,44±2,72 <sup>a</sup>	17,11±7,21 <sup>b</sup>	49,34±8,71 <sup>a</sup>

Os resultados são apresentados na forma de porcentagem das estruturas atingindo cada fase das etapas da maturação, sobre o total de oócitos maturados. Os dados são apresentados na tabela como a média das porcentagens±SEM.

<sup>ab</sup> Letras diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p<0,05$ ) pelo t-test.

Tabela 11 - Efeito da testosterona no processo de maturação *in vitro* em oócitos bovinos após 8 horas de cultivo

	GV	MI	AI	TI	MII
SFB	5,63±3,29 <sup>a</sup>	86,88±6,24 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
BSA	14,29±8,25 <sup>a</sup>	85,72±8,25 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
T 1,0µg	5,00±5,00 <sup>a</sup>	57,50±12,67 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	6,25±6,25 <sup>a</sup>
T 2,5µg	7,35±2,73 <sup>a</sup>	63,23±8,27 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	2,33±0,50 <sup>a</sup>
T 5,0µg	5,30±5,30 <sup>a</sup>	59,29±9,30 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	1,27±1,27 <sup>a</sup>
T 10,0µg	6,27±3,25 <sup>a</sup>	73,35±15,20 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	3,45±3,45 <sup>a</sup>

Os resultados são apresentados na forma de porcentagem das estruturas atingindo cada fase das etapas da maturação, sobre o total de oócitos maturados. Os dados são apresentados na tabela como a média das porcentagens±SEM.

<sup>ab</sup> Letras diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo t-test.

Tabela 12 - Efeito da testosterona no processo de maturação *in vitro* em oócitos bovinos após 16 horas de cultivo

	GV	MI	AI	TI	MII
SFB	10,53±3,07 <sup>a</sup>	21,66±4,61 <sup>a</sup>	5,15±2,38 <sup>a</sup>	61,12±6,51 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
BSA	7,85±3,90 <sup>a</sup>	12,99±3,88 <sup>a</sup>	12,19±4,44 <sup>ab</sup>	65,64±4,56 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
T 1,0µg	14,48±4,13 <sup>a</sup>	16,34±4,76 <sup>a</sup>	17,91±3,45 <sup>b</sup>	41,30±10,93 <sup>abc</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
T 2,5µg	4,89±3,01 <sup>a</sup>	24,50±6,87 <sup>ab</sup>	9,67±4,67 <sup>ab</sup>	51,03±2,96 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
T 5,0µg	3,45±2,00 <sup>a</sup>	22,69±8,10 <sup>ab</sup>	17,53±10,61 <sup>ab</sup>	49,05±2,88 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
T 10,0µg	4,44±4,44 <sup>a</sup>	41,64±5,94 <sup>b</sup>	24,45±5,04 <sup>b</sup>	25,41±3,30 <sup>c</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>

Os resultados são apresentados na forma de porcentagem das estruturas atingindo cada fase das etapas da maturação, sobre o total de oócitos maturados. Os dados são apresentados na tabela como a média das porcentagens±SEM.

<sup>ab</sup> Letras diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo t-test.

Tabela 13 - Efeito da testosterona no processo de maturação *in vitro* em oócitos bovinos após 24 horas de cultivo

	GV	MI	AI	TI	M II
SFB	7,41±7,41 <sup>ab</sup>	39,35±12,01 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>abc</sup>	53,24±8,50 <sup>a</sup>
BSA	1,33±1,33 <sup>a</sup>	39,62±10,85 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>ac</sup>	57,71±10,37 <sup>a</sup>
T 1,0µg	10,48±3,60 <sup>b</sup>	35,84±10,72 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	13,74±6,34 <sup>abc</sup>	39,94±11,05 <sup>ab</sup>
T 2,5µg	0,00±0,00 <sup>a</sup>	44,60±12,26 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	17,61±7,46 <sup>b</sup>	37,79±13,37 <sup>ab</sup>
T 5,0µg	6,67±4,44 <sup>ab</sup>	43,54±7,65 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>c</sup>	49,79±7,52 <sup>a</sup>
T 10,0µg	0,00±0,00 <sup>a</sup>	38,47±8,52 <sup>a</sup>	2,50±2,50 <sup>a</sup>	31,94±11,75 <sup>b</sup>	25,27±6,65 <sup>b</sup>

Os resultados são apresentados na forma de porcentagem das estruturas atingindo cada fase das etapas da maturação, sobre o total de oócitos maturados. Os dados são apresentados na tabela como a média das porcentagens±SEM.

<sup>ab</sup> Letras diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo t-test.

Tabela 14 - Efeito do estradiol no processo de maturação *in vitro* em oócitos bovinos após 8 horas de cultivo

	GV	MI	AI	TI	MII
SFB	5,63±3,29 <sup>a</sup>	86,88±6,24 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
BSA	14,29±8,25 <sup>a</sup>	85,72±8,25 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
E 1,0µg	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	95,50± 2,78 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
E 2,5µg	4,44 ± 4,44 <sup>a</sup>	89,11± 8,61 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
E 5,0µg	10,00±10,00 <sup>a</sup>	56,43±10,46 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	5,00±5,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
E 10,0µg	5,57 ± 5,57 <sup>a</sup>	90,27± 5,02 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>

Os resultados são apresentados na forma de porcentagem das estruturas atingindo cada fase das etapas da maturação, sobre o total de oócitos maturados. Os dados são apresentados na tabela como a média das porcentagens±SEM.

<sup>ab</sup> Letras diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p<0,05$ ) pelo t-test.

Tabela 15 - Efeito do estradiol no processo de maturação *in vitro* em oócitos bovinos após 16 horas de cultivo

	GV	M I	A I	T I	M II
SFB	10,53±3,07 <sup>a</sup>	21,66±4,61 <sup>a</sup>	5,15±2,38 <sup>ab</sup>	61,12±6,51 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
BSA	7,85±3,90 <sup>ab</sup>	12,99±3,88 <sup>a</sup>	12,19±4,44 <sup>ab</sup>	65,64±4,56 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
E 1,0µg	6,54±4,85 <sup>ab</sup>	10,54±4,06 <sup>a</sup>	3,54±2,20 <sup>a</sup>	74,38±12,99 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
E 2,5µg	1,79±1,79 <sup>b</sup>	18,45±4,09 <sup>a</sup>	10,48±6,80 <sup>ab</sup>	60,60±9,28 <sup>a</sup>	3,57±3,57 <sup>ab</sup>
E 5,0µg	2,90±1,84 <sup>b</sup>	10,70±3,30 <sup>a</sup>	13,28±3,25 <sup>b</sup>	55,45±6,94 <sup>a</sup>	5,09±3,69 <sup>ab</sup>
E 10,0µg	4,22±2,59 <sup>ab</sup>	23,30±11,41 <sup>a</sup>	9,27±5,27 <sup>ab</sup>	44,13±14,49 <sup>a</sup>	9,08±3,97 <sup>b</sup>

Os resultados são apresentados na forma de porcentagem das estruturas atingindo cada fase das etapas da maturação, sobre o total de oócitos maturados. Os dados são apresentados na tabela como a média das porcentagens±SEM.

<sup>ab</sup> Letras diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo t-test.

Tabela 16 - Efeito do estradiol no processo de maturação *in vitro* em oócitos bovinos após 24 horas de cultivo

	GV	MI	AI	TI	MII
SFB	7,41±7,41 <sup>a</sup>	39,35±12,01 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	53,24±8,50 <sup>ab</sup>
BSA	1,33±1,33 <sup>a</sup>	39,62±10,85 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	57,71±10,37 <sup>ab</sup>
E 1,0µg	0,00±0,00 <sup>a</sup>	56,75±5,98 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	36,72±4,82 <sup>a</sup>
E 2,5µg	3,67±2,26 <sup>a</sup>	50,09±6,44 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	46,24±8,15 <sup>ab</sup>
E 5,0µg	0,00±0,00 <sup>a</sup>	31,95±6,73 <sup>b</sup>	1,43±1,43 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	66,62±6,71 <sup>b</sup>
E 10,0µg	22,23±15,72 <sup>a</sup>	27,22±11,67 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	2,78±2,78 <sup>a</sup>	40,84±16,38 <sup>ab</sup>

Os resultados são apresentados na forma de porcentagem das estruturas atingindo cada fase das etapas da maturação, sobre o total de oócitos maturados. Os dados são apresentados na tabela como a média das porcentagens±SEM.

<sup>ab</sup> Letras diferentes entre si na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo t-test.

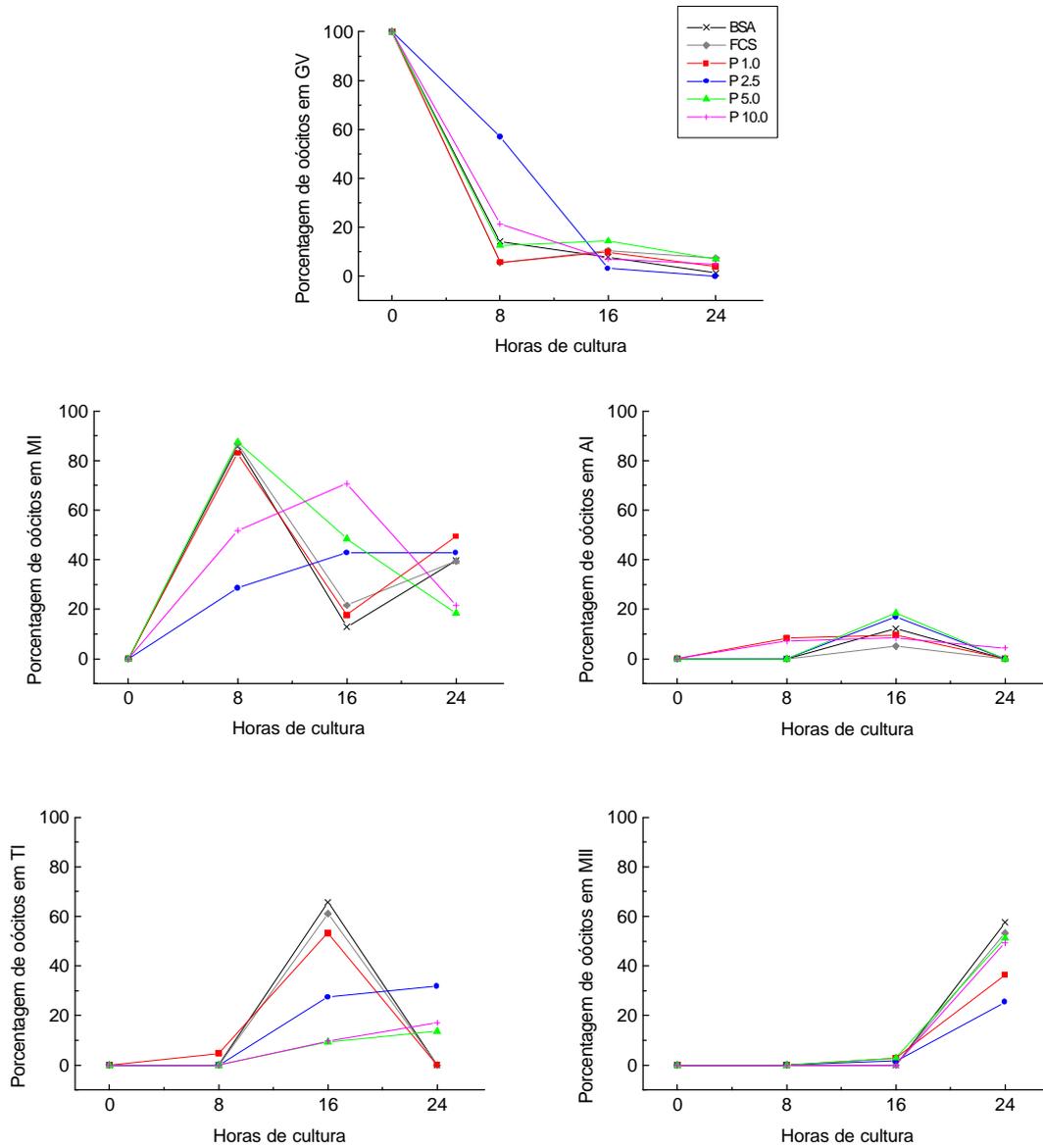


Figura 5 - Efeito da progesterona na cinética da maturação nuclear *in vitro* de óocitos bovinos.

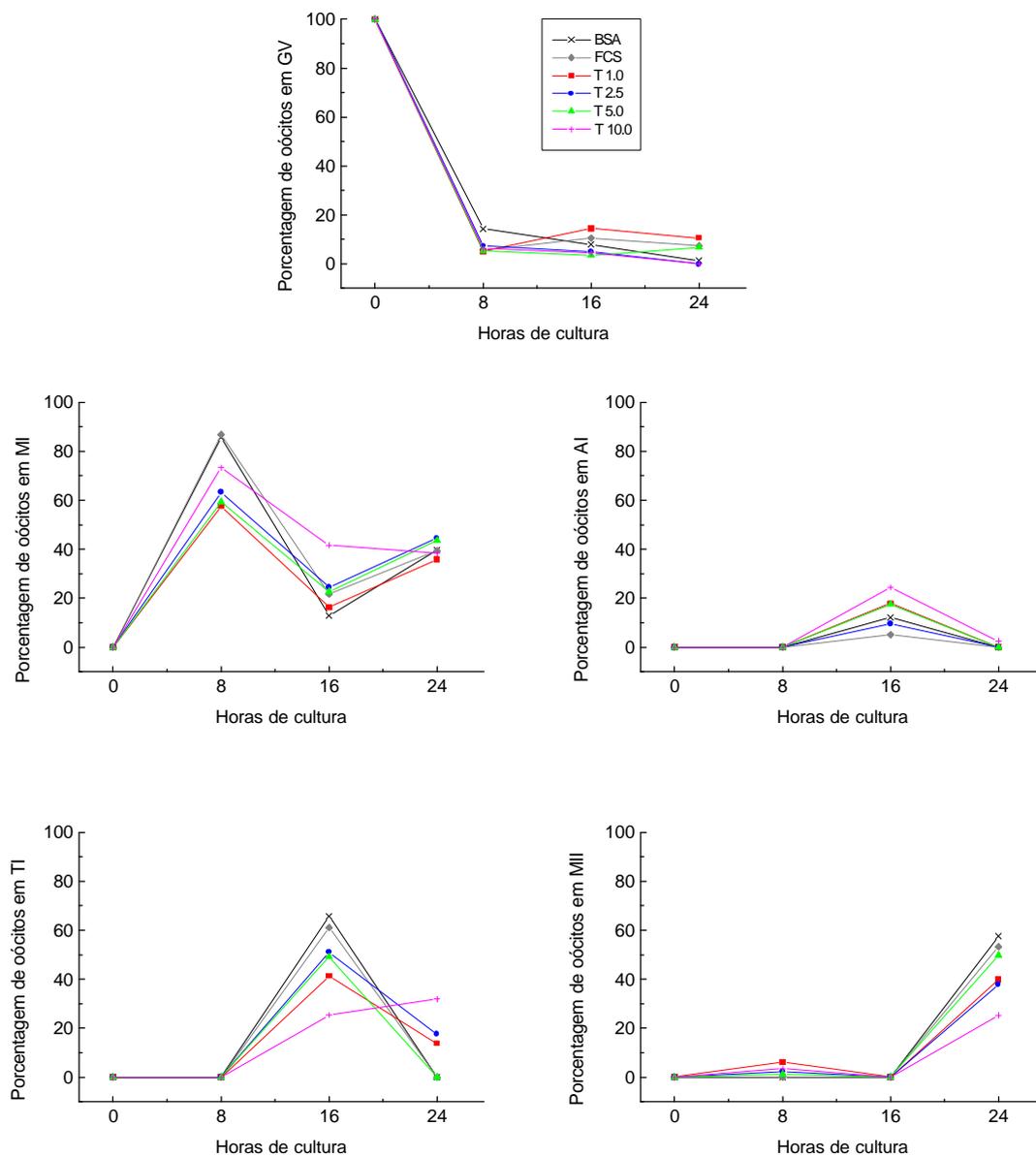


Figura 6 - Efeito da testosterona na cinética da maturação nuclear *in vitro* de óocitos bovinos.

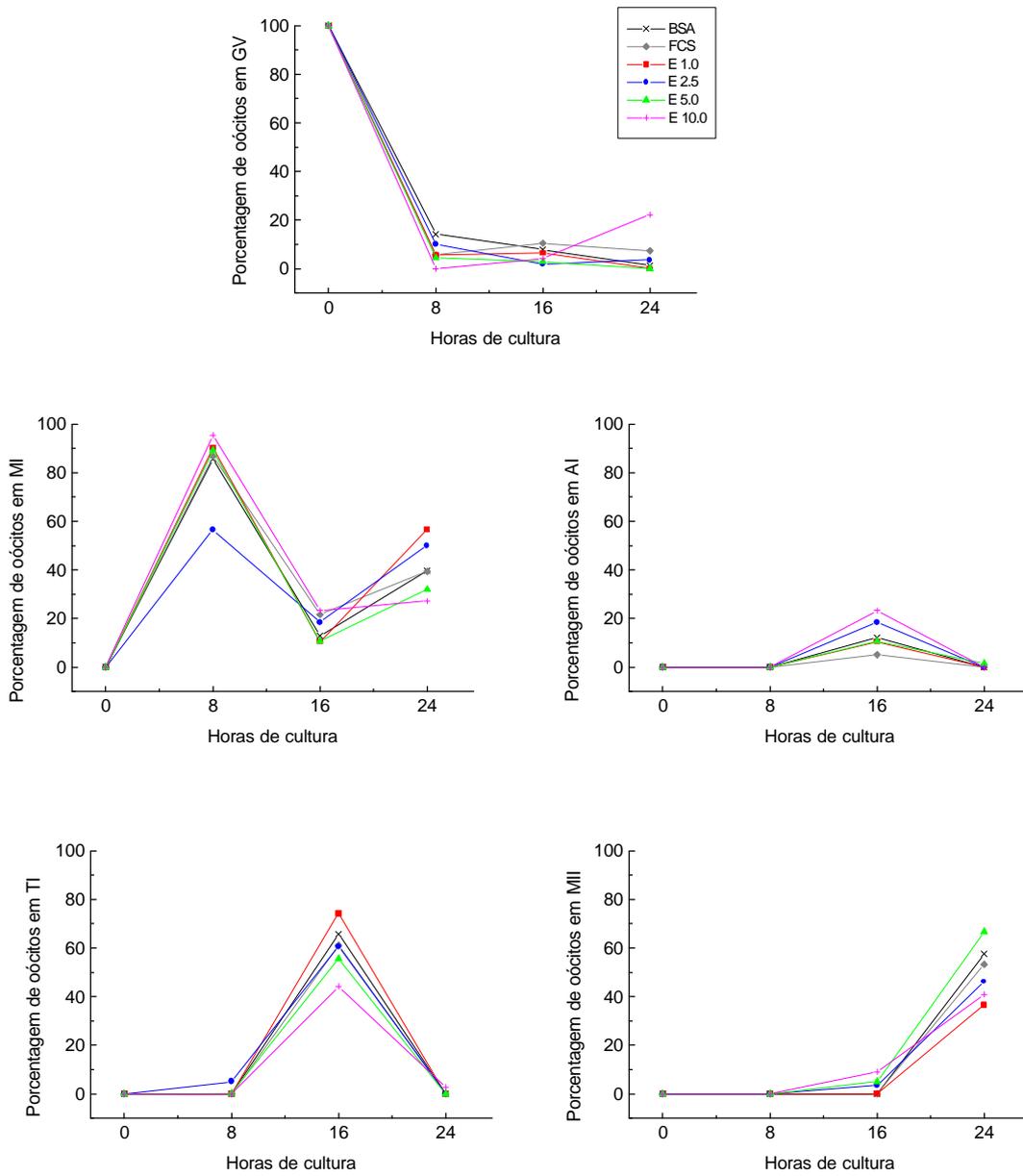


Figura 7 - Efeito do estradiol na cinética da maturação nuclear *in vitro* de óocitos bovinos.