

#### 4 – Concentração de hormônios esteróides no meio de cultura para maturação *in vitro* suplementado com BSA e hormônios esteróides em várias concentrações.

Muito embora neste experimento tenha-se retirado as células granulosa da cultura, dosou-se os hormônios esteróides do meio para se verificar a capacidade de síntese e secreção de hormônios esteróides pelas células do *cumulus* dos COCs. Ao se analisar os dados aplicando-se regressão polinomial, verificou-se que estas células também são capazes de secretar a progesterona e o estradiol durante a cultura para MIV de oócitos bovinos.

Observou-se que as células do *cumulus* produziram progesterona ( $p < 0,05$ ) quando cultivadas durante 24 horas em meio de cultura suplementado com BSA ou SFB (Tabela 17). Porém, quando este meio recebeu suplementação de progesterona, houve bloqueio desta secreção ( $p > 0,05$ ), parecendo que a progesterona se auto-regula. Quando o meio recebeu suplementação de testosterona (Tabela 18), não se observou variação significativa dos níveis de progesterona no meio durante as 24 horas de cultura ( $p > 0,05$ ), exceto quando a testosterona foi adicionada na concentração de 2,5  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,05$ ). A suplementação do meio de cultura com estradiol nas concentrações de 1,0 e 10,0  $\mu\text{g/ml}$  estimulou a produção de progesterona pelas células do *cumulus* ( $p < 0,05$ ), mas não se observou variação nos outros tratamentos (Tabela 19).

Os resultados demonstraram variação ( $p < 0,05$ ) dos níveis de testosterona durante as 24 horas de cultura quando o meio foi suplementado com BSA, SFB, progesterona a 1,0  $\mu\text{g/ml}$  (Tabela 20), testosterona a 1,0 e 5,0  $\mu\text{g/ml}$  (Tabela 21) e estradiol a 1,0, 2,5 e 10,0  $\mu\text{g/ml}$  (Tabela 22). Os resultados são inesperados, uma vez que não haviam células da teca na cultura, as quais secretam a testosterona. Todavia, ao se analisar as tabelas, pode-se verificar que o  $R^2$  é inferior a 0,70, o que significa que estatisticamente esta variação é muito baixa e biologicamente deve ser desprezada. Por outro lado, o  $R^2$  no meio suplementado com BSA e estradiol 10,0  $\mu\text{g/ml}$  foi maior do que 0,70. Esta resposta pode dever-se à contaminação do meio com testosterona proveniente de estoques intra-celulares das células do *cumulus*, entretanto, isto não foi determinado no presente experimento.

As células do *cumulus* dos COCs cultivados para MIV demonstraram ser capazes de secretar estradiol durante as 24 horas de cultura e esta secreção foi notável

quando os COCs foram cultivados em meio suplementado com BSA ( $p < 0,05$ ). Quando o meio recebeu suplementação de SFB houve uma grande oscilação dos níveis de estradiol dentre as horas estudadas. A suplementação do meio de cultura com progesterona estimulou a secreção de estradiol ( $p < 0,05$ ), exceto na concentração de 5,0  $\mu\text{g/ml}$ , cuja elevação não foi significativa (Tabela 23). Como esperado, a testosterona estimulou a produção de estradiol pelas células do cumulus ( $p < 0,05$ ), já que é o seu precursor na via esteroidogênica (Tabela 24). O estímulo foi potente quando a testosterona foi adicionada na concentração de 5,0  $\mu\text{g/ml}$ . Por outro lado, houve um decréscimo dos níveis de estradiol ( $p < 0,05$ ) no meio de cultura suplementado com estradiol (Tabela 25). Mais estudos são necessários para se verificar se o estradiol tem a capacidade de bloquear a sua própria síntese pelas células do *cumulus* na cultura, ou mesmo estimular sua degradação.

Tabela 17 - Média dos níveis de progesterona no meio cultura suplementado com progesterona, para cada hormônio e tempo de cultura. Análise de regressão polinomial dos dados transformados em log (y+1)

Hormônio	Tempo de Cultura				F	R <sup>2</sup>	Regr.
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas			
BSA	2,75	6,74	37,04	31,20	16,37 *	0,77	3° grau
SFB	0,48	8,10	9,15	6,92	34,01 *	0,89	2° grau
P 1.0 µg/ml	10500	7550	6780	9700	2,67 <sup>ns</sup>	-	-
P 2.5 µg/ml	13350	13380	9020	8917	2,25 <sup>ns</sup>	-	-
P 5.0 µg/ml	42083	59500	67800	50833	1,25 <sup>ns</sup>	-	-
P 10.0 µg/ml	61167	46333	82000	61200	1,34 <sup>ns</sup>	-	-

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

\* significativo (p<0,05)

Tabela 18 - Média dos níveis de progesterona no meio cultura suplementado com testosterona, para cada hormônio e tempo de cultura. Análise de regressão polinomial dos dados transformados em  $\log(y+1)$

Hormônio	Tempo de Cultura				F	R <sup>2</sup>	Regr.
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas			
BSA	2,75	6,74	37,04	31,20	16,37 *	0,77	3° grau
SFB	0,48	8,10	9,15	6,92	34,01 *	0,89	2° grau
T 1.0 µg/ml	38,67	20,28	62,60	49,44	2,27 <sup>ns</sup>	-	-
T 2.5 µg/ml	59,20	170,50	55,92	40,20	4,60 *	0,48	3° grau
T 5.0 µg/ml	105,50	182,80	117,60	128,80	1,12 <sup>ns</sup>	-	-
T 10.0 µg/ml	130,67	232,80	162,40	192,00	2,41 <sup>ns</sup>	-	-

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

\* significativo ( $p < 0,05$ )

Tabela 19 - Média dos níveis de progesterona no meio cultura suplementado com estradiol, para cada hormônio e tempo de cultura. Análise de regressão polinomial dos dados transformados em  $\log(y+1)$

Hormônio	Tempo de Cultura				F	R <sup>2</sup>	Regr.
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas			
BSA	2,75	6,74	37,04	31,20	16,37 *	0,77	3° grau
SFB	0,48	8,10	9,15	6,92	34,01 *	0,89	2° grau
E 1.0 µg/ml	3,43	1,97	15,92	14,04	7,41 *	0,61	3° grau
E 2.5 µg/ml	5,90	2,60	5,16	4,76	0,69 <sup>ns</sup>	-	-
E 5.0 µg/ml	8,36	3,02	11,87	21,10	2,55 <sup>ns</sup>	-	-
E 10.0 µg/ml	7,06	0,88	9,37	15,87	5,05 *	0,50	3° grau

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

\* significativo ( $p < 0,05$ )

Tabela 20 - Média dos níveis de testosterona no meio cultura suplementado com progesterona, para cada hormônio e tempo de cultura. Análise de regressão polinomial dos dados transformados em  $\log (y+1)$

Hormônio	Tempo de Cultura				F	R <sup>2</sup>	Regr
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas			
BSA	1,10	0,84	9,93	3,31	18,67 *	0,80	3° grau
SFB	0,43	0,79	2,20	0,48	5,20 *	0,54	2° grau
P 1.0 µg/ml	6,88	3,02	8,56	6,32	3,99 *	0,44	3° grau
P 2.5 µg/ml	4,42	5,08	8,24	7,13	1,89 <sup>ns</sup>	-	-
P 5.0 µg/ml	7,67	5,88	8,60	12,27	2,89 <sup>ns</sup>	-	-
P 10.0 µg/ml	14,58	11,25	16,00	23,26	1,46 <sup>ns</sup>	-	-

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

\* significativo ( $p < 0,05$ )

Tabela 21 - Média dos níveis de testosterona no meio cultura suplementado com testosterona, para cada hormônio e tempo de cultura. Análise de regressão polinomial dos dados transformados em  $\log(y+1)$

Hormônio	Tempo de Cultura				F	R <sup>2</sup>	Regr.
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas			
BSA	1,10	0,84	9,93	3,31	18,67 *	0,80	3° grau
SFB	0,43	0,79	2,20	0,48	5,20 *	0,54	2° grau
T 1.0 µg/ml	6833	15760	11150	15240	3,63 *	0,46	3° grau
T 2.5 µg/ml	18400	16000	17560	19400	0,28 <sup>ns</sup>	-	-
T 5.0 µg/ml	50500	100400	546667	93000	3,99 *	0,50	3° grau
T 10.0 µg/ml	90833	101400	91500	97200	0,13 <sup>ns</sup>	-	-

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

\* significativo ( $p < 0,05$ )

Tabela 22 - Média dos níveis de testosterona no meio cultura suplementado com estradiol, para cada hormônio e tempo de cultura. Análise de regressão polinomial dos dados transformados em  $\log(y+1)$

Hormônio	Tempo de Cultura				F	R <sup>2</sup>	Regr.
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas			
BSA	1,10	0,84	9,93	3,31	18,67 *	0,80	3° grau
SFB	0,43	0,79	2,20	0,48	5,20 *	0,54	2° grau
E 1.0 µg/ml	2,12	5,70	1,69	2,66	3,92 *	0,44	3 ° grau
E 2.5 µg/ml	8,17	1,33	6,58	5,12	6,49 *	0,58	3° grau
E 5.0 µg/ml	14,60	5,52	7,82	10,20	1,95 <sup>ns</sup>	-	-
E 10.0 µg/ml	4,88	5,54	2,44	32,10	30,25 *	0,85	3° grau

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

\* significativo ( $p < 0,05$ )



Tabela 23 - Média dos níveis de estradiol no meio cultura suplementado com progesterona, para cada hormônio e tempo de cultura. Análise de regressão polinomial dos dados transformados em log (y+1)

Hormônio	Tempo de Cultura				F	R <sup>2</sup>	Regr.
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas			
BSA	0,00	0,69	124,00	128,50	182,89 *	0,98	3° grau
SFB	168,00	0,02	300,00	0,65	441,33 *	0,99	3° grau
P 1.0 µg/ml	99,33	11,16	151,60	165,60	19,70 *	0,81	3° grau
P 2.5 µg/ml	0,33	9,64	1,80	6,17	14,59 *	0,71	3° grau
P 5.0 µg/ml	0,87	1,81	3,64	3,78	1,58 <sup>ns</sup>	-	-
P 10.0 µg/ml	0,21	10,05	22,84	27,28	9,31 *	0,64	1° grau

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

\* significativo (p<0,05)

Tabela 24 - Média dos níveis de estradiol no meio cultura suplementado com testosterona, para cada hormônio e tempo de cultura. Análise de regressão polinomial dos dados transformados em  $\log(y+1)$

Hormônio	Tempo de Cultura				F	R <sup>2</sup>	Regr.
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas			
BSA	0,00	0,69	124,00	128,50	182,89 *	0,98	3° grau
SFB	168,00	0,02	300,00	0,65	441,33 *	0,99	3° grau
T 1.0 µg/ml	0,19	0,18	0,53	0,07	4,39 *	0,50	3° grau
T 2.5 µg/ml	0,06	0,21	0,52	0,10	4,90 *	0,49	2° grau
T 5.0 µg/ml	0,10	0,69	0,57	4,16	44,56 *	0,91	3° grau
T 10.0 µg/ml	0,11	0,45	0,85	1,04	6,53 *	0,54	1° grau

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

\* significativo ( $p < 0,05$ )

Tabela 25 - Média dos níveis de estradiol no meio cultura suplementado com estradiol, para cada hormônio e tempo de cultura. Análise de regressão polinomial dos dados transformados em  $\log(y+1)$

Hormônio	Tempo de Cultura				F	R <sup>2</sup>	Regr.
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas			
BSA	0,00	0,69	124,00	128,50	182,89 *	0,98	3° grau
SFB	168,00	0,02	300,00	0,65	441,33 *	0,99	3° grau
E 1.0 µg/ml	2600	2130	34,25	21,40	293,80 *	0,99	3° grau
E 2.5 µg/ml	4100	15,56	2960	2340	737,75 *	0,99	3° grau
E 5.0 µg/ml	1148	1192	1228	672,50	1,46 <sup>ns</sup>	-	-
E 10.0 µg/ml	9850	6400	163,33	113,20	271,83 *	0,99	3° grau

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

\* significativo ( $p < 0,05$ )

O coeficiente da variação dos níveis de progesterona na cultura foi significativo ( $p < 0,05$ ) para os diversos esteróides adicionados ao meio (progesterona, testosterona e estradiol), tempo e interação hormônio x tempo (Tabela 26). Ao se analisar os níveis de progesterona no meio de cultura suplementado com SFB (Tabela 26a e Figura 8), notou-se inesperadamente uma semelhança entre padrão de secreção e níveis do hormônio com aqueles do meio suplementado com SFB do experimento de suplementação do meio com soro bovino e células da granulosa (Tabela 2), exceto no final da cultura. A comparação nos permitiu verificar que, apesar da ausência das células da granulosa e número menor de COCs na cultura, as células do *cumulus* se comportaram de uma maneira semelhante no início da cultura, entretanto, provavelmente em decorrência destes fatos, a secreção de progesterona no final da cultura foi menor.

De acordo com os resultados, pôde-se verificar que a adição de BSA contaminou a cultura com progesterona (Tabela 26a e Figura 8) e que na presença de BSA, as células do *cumulus* foram estimuladas a secretar progesterona ao final da cultura, indicando um processo de luteinização. Neste caso, os níveis de progesterona foram significativamente maiores do que os do meio suplementado com SFB (Tabela 26 a). Com relação aos meios de cultura suplementados com progesterona, não se notou grandes variações dos níveis deste hormônio de acordo com o tempo, o mesmo ocorrendo com o meio suplementado com testosterona. Entretanto, os níveis de progesterona no meio suplementado com testosterona a 5,0 e 10,0  $\mu\text{g/ml}$  foram significativamente maiores do que os outros grupos (Tabela 26b e Figura 9). Com relação ao meio suplementado com estradiol, notou-se variação significativa dos níveis de progesterona entre os grupos, exceto para o meio suplementado com estradiol a 2,5  $\mu\text{g/ml}$ , cujos níveis de progesterona no final da cultura foram significativamente inferiores quando comparados com o meio suplementado com BSA (Tabela 26c e Figura 10).

O coeficiente da variação dos níveis de testosterona na cultura foi significativo ( $p < 0,05$ ) para os diversos esteróides adicionados ao meio (progesterona, testosterona e estradiol), tempo e interação hormônio x tempo (Tabela 27). Verificou-se diferença significativa ao se comparar os níveis de testosterona dos meios suplementados com BSA e SFB, indicando que o BSA contaminou muito mais a cultura com testosterona do

que o SFB (Tabela 27a e Figura 11). Houve diferença significativa com relação aos níveis de testosterona no meio de cultura entre os grupos suplementados com 1,0 e 2,5 µg/ml de testosterona e 5,0 e 10,0 µg/ml (Tabela 27b e Figura 12). Não houve grande variação dos níveis de testosterona em meio suplementado com estradiol para os tempos 0, 8 e 16 horas de cultura, mas no tempo 24 horas, verificou-se que quanto maior a concentração de estradiol adicionado ao meio de cultura, maior o nível de testosterona (Tabela 27c e Figura 13).

Da mesma maneira do que para os outros esteróides, o coeficiente da variação dos níveis de estradiol na cultura foi significativo ( $p < 0,05$ ) para progesterona, testosterona e estradiol adicionados ao meio, tempo e interação hormônio x tempo (Tabela 28). Pôde-se verificar que o BSA não contaminou a cultura com estradiol (Tabela 28a). Por outro lado, o SFB forneceu ao meio elevadas concentrações de estradiol (Tabela 28a), como anteriormente notado no experimento de suplementação do meio com soro bovino (Tabela 4). Verificou-se que as células do *cumulus* são capazes de secretar estradiol quando os COCs são cultivados em meio suplementado com BSA, mesmo na presença de progesterona (Tabela 28a e Figura 14). Entretanto, notadamente às 24 horas de cultivo, notou-se que a concentração de estradiol foi menor no meio suplementado com altas doses de progesterona (Tabela 28a e Figura 14). Muito embora as células do *cumulus* tenham demonstrado ser estimuladas a produzir estradiol quando o meio foi suplementado com BSA, houve bloqueio quando a testosterona foi adicionada à este meio, apesar da testosterona ser precursora do estradiol (Tabela 28b e Figura 15). Quando o meio recebeu suplementação de estradiol, a variação dos níveis de estradiol entre os grupos foi muito grande, entretanto, parece que o estradiol foi consumido e/ou degradado ao longo do tempo para todos os grupos analisados (Tabela 28c e Figura 16).

Com relação à análise de secreção de esteróides por células da granulosa em meio de cultura para MIV de oócitos bovinos, os resultados demonstraram uma grande variabilidade dos níveis dos hormônios no mesmo tratamento, apesar de se ter abolido a co-cultura de células da granulosa e o soro bovino. Faz necessário ressaltar que neste experimento, as culturas não foram as mesmas ao longo do tempo (culturas diferentes para os tempos 8, 16 e 24 horas), ao contrário do experimento de adição de soro bovino e células da granulosa ao meio, onde os esteróides foram dosados sempre do mesmo

meio de cultura ao longo do tempo (meio de cultura aliquotado da mesma placa de cultivo após 6, 12 e 24 horas de cultivo). Desta maneira, os resultados indicaram que as células do cumulus dos COCs foram capazes de secretar progesterona e estradiol em meio de cultura suplementado com BSA, mas mesmo na ausência de co-cultivo de células da granulosa provenientes de diferentes folículos ovarianos e na ausência de soro bovino como suplemento do meio de cultura, a repetibilidade foi ainda muito baixa. Provavelmente, a capacidade esteroidogênica dos COCs esteja relacionada ao seu folículo de origem, dependendo do tamanho do folículo e status fisiológico (dominância ou subordinação do folículo, dentre outros fatores).

Figura 8 - Níveis de progesterona (ng/ml) em meio de cultura para maturação *in vitro* de oócitos bovinos suplementado com progesterona.

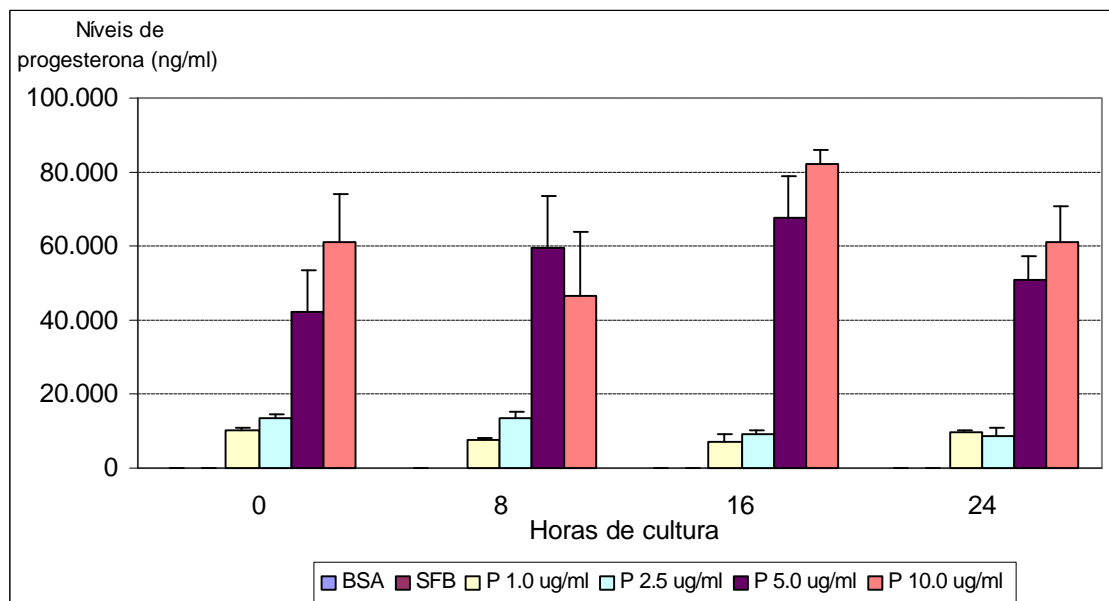


Figura 9 - Níveis de progesterona (ng/ml) em meio de cultura para maturação *in vitro* de oócitos bovinos suplementado com testosterona.

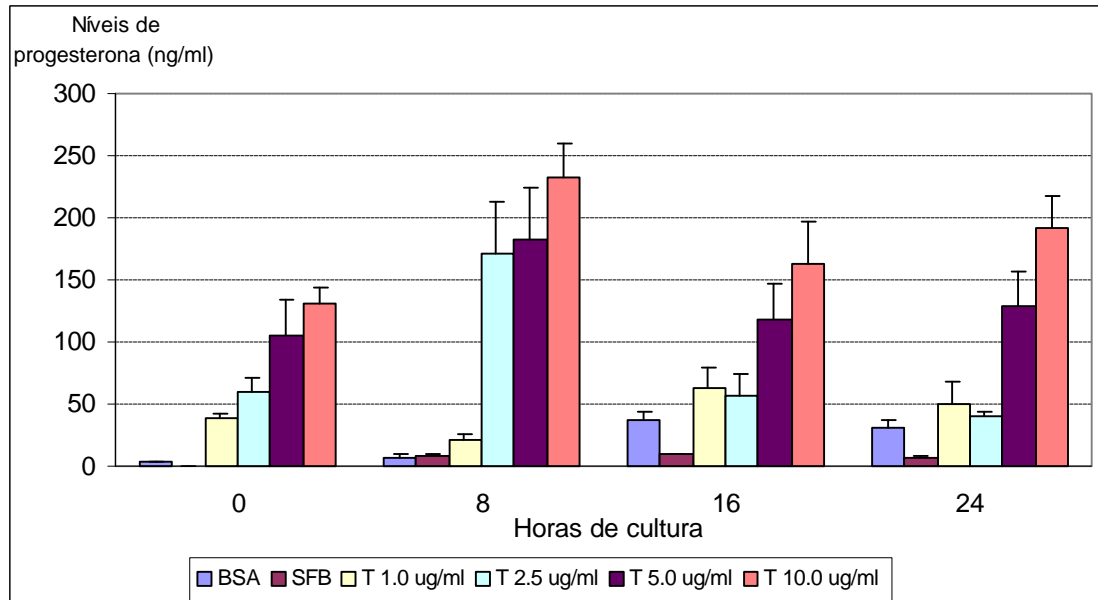


Figura 10 - Níveis de progesterona (ng/ml) em meio de cultura para maturação *in vitro* de oócitos bovinos suplementado com estradiol.

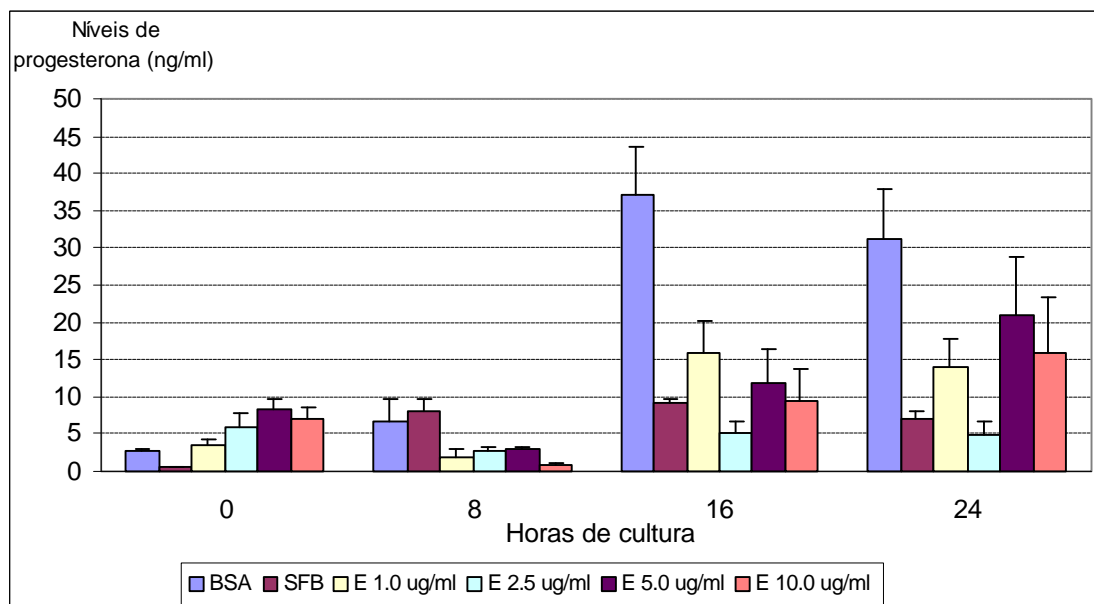


Figura 11 - Níveis de testosterona (ng/ml) em meio de cultura para maturação *in vitro* de oócitos bovinos suplementado com progesterona

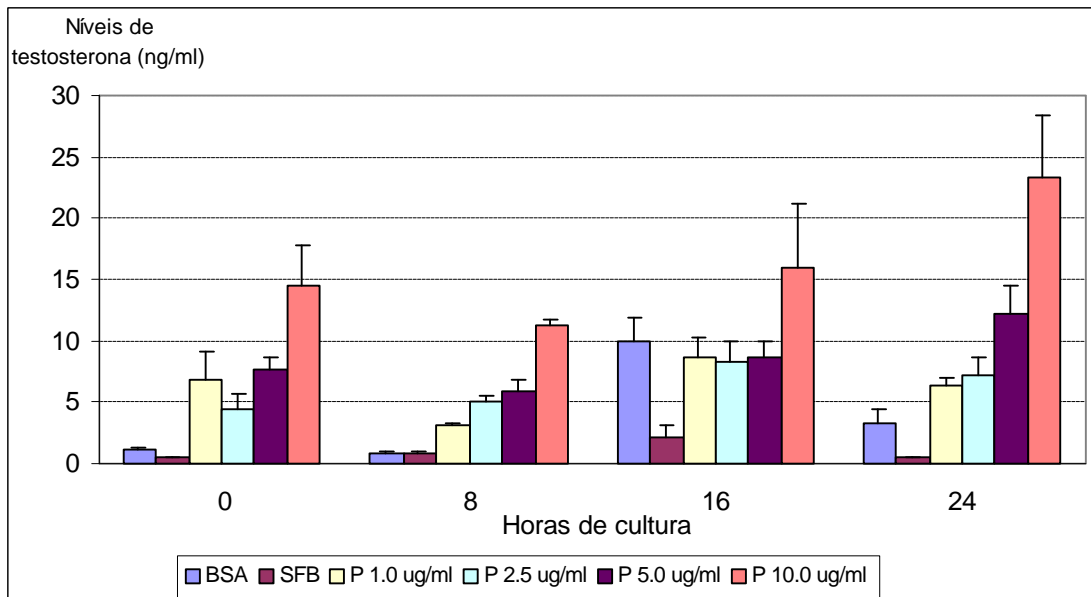


Figura 12 - Níveis de testosterona em meio de cultura (ng/ml) para maturação *in vitro* de oócitos bovinos suplementado com testosterona.

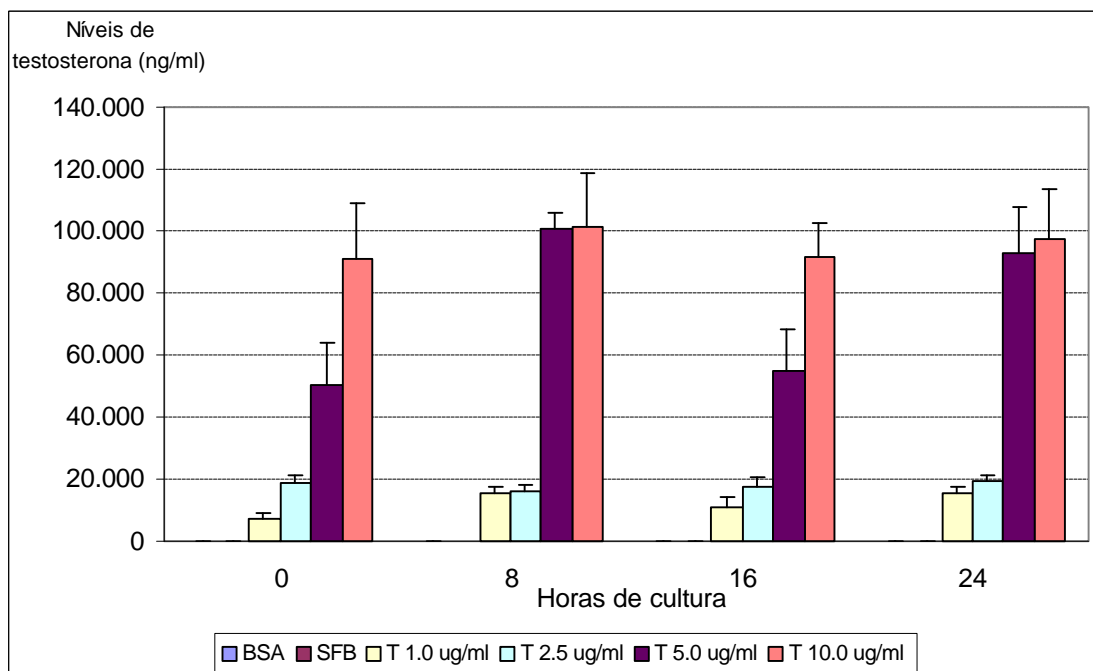




Figura 13 - Níveis de testosterona em meio de cultura (ng/ml) para maturação *in vitro* de oócitos bovinos suplementado com estradiol.

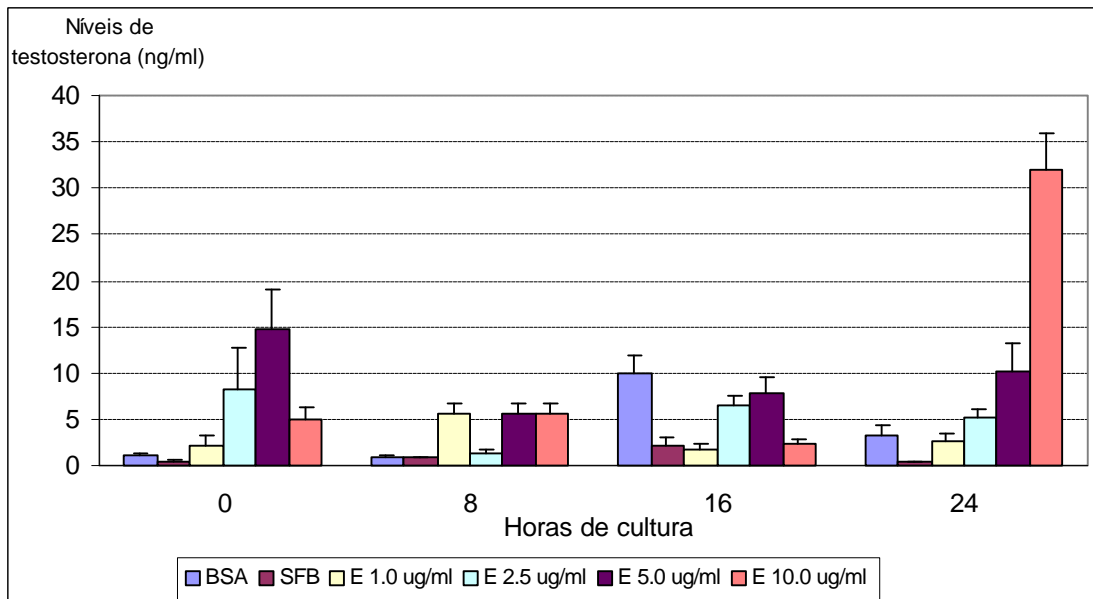


Figura 14 - Níveis de estradiol em meio de cultura (ng/ml) para maturação *in vitro* de oócitos bovinos suplementado com progesterona.

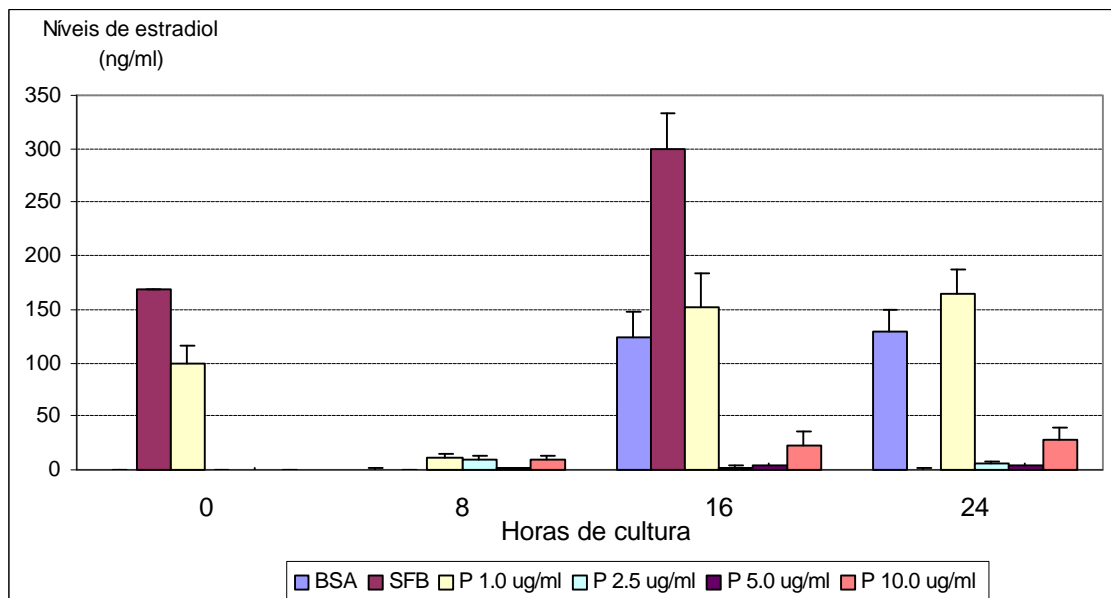


Figura 15 - Níveis de estradiol em meio de cultura (ng/ml) para maturação *in vitro* de oócitos bovinos suplementado com testosterona.

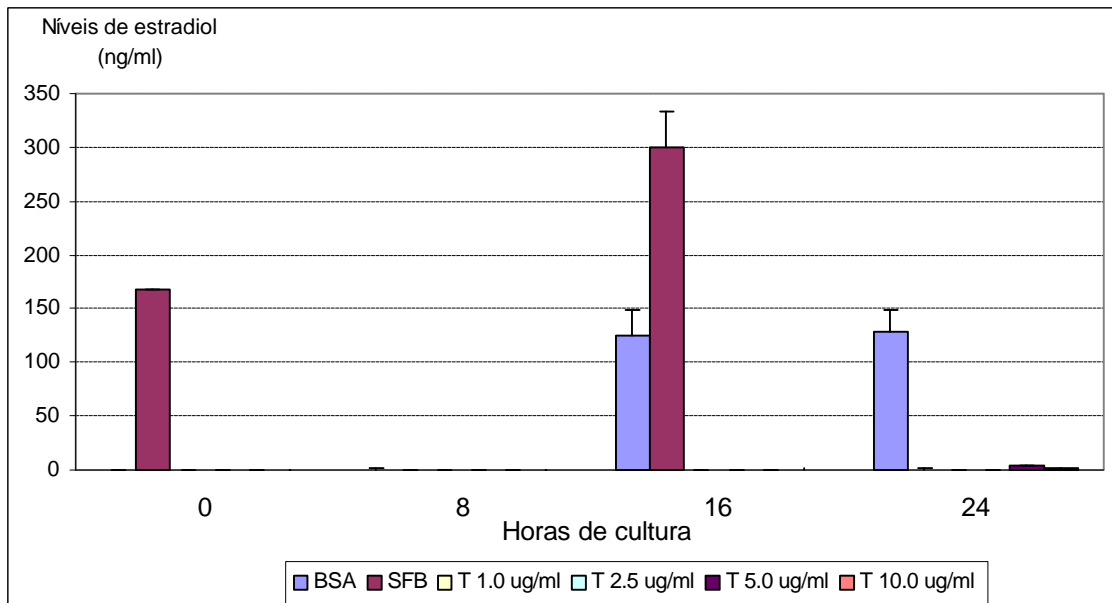


Figura 16 - Níveis de estradiol em meio de cultura (ng/ml) para maturação *in vitro* de oócitos bovinos suplementado com estradiol.

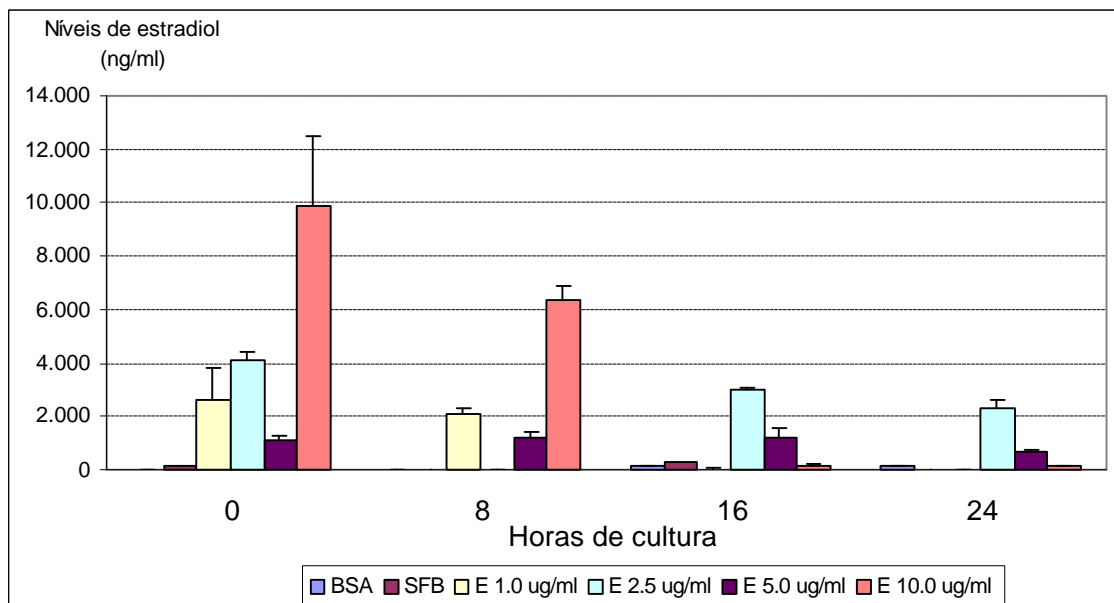


Tabela 26 - Valores de F e Coeficiente de Variação (CV) obtidos na análise de variância dos níveis de progesterona avaliados nos meios de cultura

Estatísticas	Meios de cultura <sup>1</sup>		
	Progesterona	Testosterona	Estradiol
Hormônio	1337,33 *	113,97 *	5,27 *
F Tempo	11,49 *	11,56 *	23,11 *
Interação Hormônio x Tempo	6,99 *	6,33 *	3,49 *
CV %	6,26	14,16	32,90

<sup>1</sup> dados transformados em  $\log(x+1)$

\* significativo ao nível de 5% ( $p < 0,05$ )

Tabela 26a - Média e erro padrão da média dos níveis de progesterona no meio de cultura suplementado com progesterona, para cada hormônio e tempo de cultura

Hormônio	Tempo de Cultura (média ± EPM)			
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas
BSA	2,75 ± 0,21 <sup>a</sup>	6,74 ± 2,98 <sup>a</sup>	37,04 ± 6,59 <sup>a</sup>	31,20 ± 6,68 <sup>a</sup>
FCS	0,48 ± 0,12 <sup>a</sup>	8,10 ± 1,68 <sup>a</sup>	9,15 ± 0,57 <sup>b</sup>	6,92 ± 1,15 <sup>b</sup>
P 1,0 µg/ml	10500 ± 500 <sup>b</sup>	7550 ± 538 <sup>b</sup>	6780 ± 2310 <sup>c</sup>	9700 ± 732 <sup>c</sup>
P 2,5 µg/ml	13350 ± 1001 <sup>b</sup>	13380 ± 1989 <sup>bc</sup>	9020 ± 1365 <sup>c</sup>	8917 ± 2008 <sup>c</sup>
P 5,0 µg/ml	42083 ± 11385 <sup>c</sup>	59500 ± 13913 <sup>d</sup>	67800 ± 10984 <sup>d</sup>	50833 ± 6199 <sup>d</sup>
P 10,0 µg/ml	61167 ± 12885 <sup>c</sup>	46333 ± 17648 <sup>cd</sup>	82000 ± 3847 <sup>d</sup>	61200 ± 9541 <sup>d</sup>

Médias seguidas de letras diferentes, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Tabela 26b - Média e erro padrão da média dos níveis de progesterona no meio de cultura suplementado com testosterona, para cada hormônio e tempo de cultura

Hormônio	Tempo de Cultura (média ± EPM)			
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas
BSA	2,75 ± 0,21 <sup>a</sup>	6,74 ± 2,98 <sup>a</sup>	37,04 ± 6,59 <sup>a</sup>	31,20 ± 6,68 <sup>a</sup>
FCS	0,48 ± 0,12 <sup>b</sup>	8,10 ± 1,68 <sup>a</sup>	9,15 ± 0,57 <sup>b</sup>	6,92 ± 1,15 <sup>b</sup>
T 1,0 µg/ml	38,67 ± 4,06 <sup>c</sup>	20,28 ± 5,93 <sup>a</sup>	62,60 ± 16,88 <sup>ac</sup>	49,44 ± 17,59 <sup>a</sup>
T 2,5 µg/ml	59,20 ± 12,32 <sup>cd</sup>	170,50 ± 41,60 <sup>b</sup>	55,92 ± 18,68 <sup>a</sup>	40,20 ± 3,23 <sup>a</sup>
T 5,0 µg/ml	105,50 ± 28,25 <sup>de</sup>	182,80 ± 40,83 <sup>b</sup>	117,60 ± 29,36 <sup>c</sup>	128,80 ± 27,32 <sup>c</sup>
T 10,0 µg/ml	130,67 ± 13,49 <sup>e</sup>	232,80 ± 27,20 <sup>b</sup>	162,40 ± 33,95 <sup>c</sup>	192,00 ± 26,50 <sup>c</sup>

Médias seguidas de letras diferentes, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05)

Tabela 26c - Média e erro padrão da média dos níveis de progesterona no meio de cultura suplementado com estradiol, para cada hormônio e tempo de cultura

Hormônio	Tempo de Cultura (média ± EPM)			
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas
BSA	2,75 ± 0,21 <sup>ab</sup>	6,74 ± 2,98 <sup>ab</sup>	37,04 ± 6,59 <sup>a</sup>	31,20 ± 6,68 <sup>a</sup>
FCS	0,48 ± 0,12 <sup>b</sup>	8,10 ± 1,68 <sup>a</sup>	9,15 ± 0,57 <sup>ab</sup>	6,92 ± 1,15 <sup>ab</sup>
E 1,0 µg/ml	3,43 ± 0,96 <sup>ab</sup>	1,97 ± 1,11 <sup>b</sup>	15,92 ± 4,26 <sup>ab</sup>	14,04 ± 3,71 <sup>ab</sup>
E 2,5 µg/ml	5,90 ± 1,95 <sup>a</sup>	2,60 ± 0,76 <sup>ab</sup>	5,16 ± 1,54 <sup>b</sup>	4,76 ± 1,92 <sup>b</sup>
E 5,0 µg/ml	8,36 ± 1,45 <sup>a</sup>	3,02 ± 0,27 <sup>ab</sup>	11,87 ± 4,45 <sup>ab</sup>	21,10 ± 7,65 <sup>ab</sup>
E 10,0 µg/ml	7,06 ± 2,39 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,10 <sup>b</sup>	9,37 ± 4,01 <sup>b</sup>	15,87 ± 6,17 <sup>ab</sup>

Médias seguidas de letras diferentes, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05)

Tabela 27 - Valores de F e Coeficiente de Variação (CV) obtidos na análise de variância dos níveis de testosterona avaliados nos meios de cultura

Estatísticas		Meios de cultura <sup>1</sup>		
		Progesterona	Testosterona	Estradiol
	Hormônio	52,67 *	2174,25 *	26,42 *
F	Tempo	15,75 *	6,43 *	7,41 *
	Interação Hormônio x Tempo	2,83 *	4,52 *	10,01 *
	CV %	21,76	5,31	29,18

<sup>1</sup> dados transformados em  $\log(x+1)$

\* significativo ao nível de 5% ( $p < 0,05$ )

Tabela 27a - Média e erro padrão da média dos níveis de testosterona no meio de cultura suplementado com progesterona, para cada hormônio e tempo de cultura

Hormônio	Tempo de Cultura (média $\pm$ EPM)			
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas
BSA	1,10 $\pm$ 0,23 <sup>ab</sup>	0,84 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	9,93 $\pm$ 2,01 <sup>a</sup>	3,31 $\pm$ 1,05 <sup>a</sup>
FCS	0,43 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	0,79 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	2,20 $\pm$ 0,87 <sup>b</sup>	0,48 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>
P 1,0 $\mu$ g/ml	6,88 $\pm$ 2,24 <sup>cd</sup>	3,02 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup>	8,56 $\pm$ 1,64 <sup>a</sup>	6,32 $\pm$ 0,70 <sup>ac</sup>
P 2,5 $\mu$ g/ml	4,42 $\pm$ 1,35 <sup>bc</sup>	5,08 $\pm$ 0,46 <sup>bc</sup>	8,24 $\pm$ 1,74 <sup>a</sup>	7,13 $\pm$ 1,57 <sup>ac</sup>
P 5,0 $\mu$ g/ml	7,67 $\pm$ 0,94 <sup>cd</sup>	5,88 $\pm$ 1,04 <sup>c</sup>	8,60 $\pm$ 1,36 <sup>a</sup>	12,27 $\pm$ 2,27 <sup>cd</sup>
P 10,0 $\mu$ g/ml	14,58 $\pm$ 3,18 <sup>d</sup>	11,25 $\pm$ 0,48 <sup>d</sup>	16,00 $\pm$ 5,20 <sup>a</sup>	23,26 $\pm$ 5,16 <sup>d</sup>

Médias seguidas de letras diferentes, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Tabela 27b - Média e erro padrão da média dos níveis de testosterona no meio de cultura suplementado com testosterona, para cada hormônio e tempo de cultura

Hormônio	Tempo de Cultura (média ± EPM)			
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas
BSA	1,10 ± 0,23 <sup>a</sup>	0,84 ± 0,16 <sup>a</sup>	9,93 ± 2,01 <sup>a</sup>	3,31 ± 1,05 <sup>a</sup>
FCS	0,43 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,17 <sup>a</sup>	2,20 ± 0,87 <sup>b</sup>	0,48 ± 0,06 <sup>b</sup>
T 1,0 µg/ml	6833 ± 2085 <sup>b</sup>	15760 ± 1832 <sup>b</sup>	11150 ± 3025 <sup>c</sup>	15240 ± 2073 <sup>c</sup>
T 2,5 µg/ml	18400 ± 2821 <sup>bc</sup>	16000 ± 2273 <sup>b</sup>	17560 ± 2996 <sup>c</sup>	19400 ± 1939 <sup>c</sup>
T 5,0 µg/ml	50500 ± 13219 <sup>cd</sup>	100400 ± 5115 <sup>c</sup>	546667 ± 13860 <sup>d</sup>	93000 ± 14457 <sup>d</sup>
T 10,0 µg/ml	90833 ± 17893 <sup>d</sup>	101400 ± 17116 <sup>c</sup>	91500 ± 11295 <sup>d</sup>	97200 ± 16427 <sup>d</sup>

Médias seguidas de letras diferentes, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05)

Tabela 27c - Média e erro padrão da média dos níveis de testosterona no meio de cultura suplementado com estradiol, para cada hormônio e tempo de cultura

Hormônio	Tempo de Cultura (média ± EPM)			
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas
BSA	1,10 ± 0,23 <sup>a</sup>	0,84 ± 0,16 <sup>a</sup>	9,93 ± 2,01 <sup>a</sup>	3,31 ± 1,05 <sup>a</sup>
FCS	0,43 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,17 <sup>a</sup>	2,20 ± 0,87 <sup>b</sup>	0,48 ± 0,06 <sup>b</sup>
E 1,0 µg/ml	2,12 ± 1,14 <sup>a</sup>	5,70 ± 0,95 <sup>b</sup>	1,69 ± 0,64 <sup>b</sup>	2,66 ± 0,76 <sup>ab</sup>
E 2,5 µg/ml	8,17 ± 4,58 <sup>ab</sup>	1,33 ± 0,32 <sup>a</sup>	6,58 ± 1,09 <sup>ac</sup>	5,12 ± 0,91 <sup>ac</sup>
E 5,0 µg/ml	14,60 ± 4,48 <sup>b</sup>	5,52 ± 1,29 <sup>b</sup>	7,82 ± 1,68 <sup>a</sup>	10,20 ± 2,91 <sup>c</sup>
E 10,0 µg/ml	4,88 ± 1,41 <sup>ab</sup>	5,54 ± 1,06 <sup>b</sup>	2,44 ± 0,43 <sup>bc</sup>	32,10 ± 3,89 <sup>d</sup>

Médias seguidas de letras diferentes, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05)

Tabela 28 - Valores de F e Coeficiente de Variação (CV) obtidos na análise de variância dos níveis de estradiol avaliados nos meios de cultura

Estatísticas		Meios de cultura <sup>1</sup>		
		Progesterona	Testosterona	Estradiol
	Hormônio	58,11 *	364,98 *	612,86 *
F	Tempo	49,72 *	244,11 *	155,07 *
	Interação Hormônio x Tempo	29,26 *	171,16 *	238,14 *
	CV %	30,48	23,12	6,35

<sup>1</sup> dados transformados em  $\log(x+1)$

\* significativo ao nível de 5% ( $p < 0,05$ )

Tabela 28a - Média e erro padrão da média dos níveis de estradiol no meio de cultura suplementado com progesterona, para cada hormônio e tempo de cultura

Hormônio	Tempo de Cultura (média $\pm$ EPM)			
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas
BSA	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,69 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>	124,00 $\pm$ 24,40 <sup>a</sup>	128,50 $\pm$ 20,92 <sup>a</sup>
FCS	168,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	0,02 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	300,00 $\pm$ 32,71 <sup>a</sup>	0,65 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>
P 1,0 $\mu$ g/ml	99,33 $\pm$ 16,83 <sup>b</sup>	11,16 $\pm$ 4,15 <sup>b</sup>	151,60 $\pm$ 32,61 <sup>a</sup>	165,60 $\pm$ 22,44 <sup>a</sup>
P 2,5 $\mu$ g/ml	0,33 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	9,64 $\pm$ 2,84 <sup>b</sup>	1,80 $\pm$ 1,13 <sup>b</sup>	6,17 $\pm$ 1,07 <sup>cd</sup>
P 5,0 $\mu$ g/ml	0,87 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>	1,81 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	3,64 $\pm$ 1,53 <sup>b</sup>	3,78 $\pm$ 0,98 <sup>bc</sup>
P 10,0 $\mu$ g/ml	0,21 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	10,05 $\pm$ 2,44 <sup>b</sup>	22,84 $\pm$ 12,18 <sup>b</sup>	27,28 $\pm$ 12,83 <sup>d</sup>

Médias seguidas de letras diferentes, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Tabela 28b - Média e erro padrão da média dos níveis de estradiol no meio de cultura suplementado com testosterona, para cada hormônio e tempo de cultura

Hormônio	Tempo de Cultura (média ± EPM)			
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas
BSA	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,69 ± 0,40 <sup>ab</sup>	124,00 ± 24,40 <sup>a</sup>	128,50 ± 20,92 <sup>a</sup>
FCS	168,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	300,00 ± 32,71 <sup>b</sup>	0,65 ± 0,35 <sup>bd</sup>
T 1,0 µg/ml	0,19 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,18 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,53 ± 0,23 <sup>c</sup>	0,07 ± 0,02 <sup>b</sup>
T 2,5 µg/ml	0,06 ± 0,04 <sup>ac</sup>	0,21 ± 0,06 <sup>ab</sup>	0,52 ± 0,20 <sup>c</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>b</sup>
T 5,0 µg/ml	0,10 ± 0,04 <sup>ac</sup>	0,69 ± 0,19 <sup>b</sup>	0,57 ± 0,17 <sup>c</sup>	4,16 ± 0,43 <sup>c</sup>
T 10,0 µg/ml	0,11 ± 0,04 <sup>ac</sup>	0,45 ± 0,14 <sup>ab</sup>	0,85 ± 0,28 <sup>c</sup>	1,04 ± 0,23 <sup>d</sup>

Médias seguidas de letras diferentes, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Tabela 28c - Média e erro padrão da média dos níveis de estradiol no meio de cultura suplementado com estradiol, para cada hormônio e tempo de cultura

Hormônio	Tempo de Cultura (média ± EPM)			
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas
BSA	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,69 ± 0,40 <sup>a</sup>	124,00 ± 24,40 <sup>a</sup>	128,50 ± 20,92 <sup>a</sup>
FCS	168,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	300,00 ± 32,71 <sup>b</sup>	0,65 ± 0,35 <sup>b</sup>
E 1,0 µg/ml	2600 ± 1200 <sup>cd</sup>	2130 ± 182,76 <sup>b</sup>	34,25 ± 4,77 <sup>c</sup>	21,40 ± 2,01 <sup>c</sup>
E 2,5 µg/ml	4100 ± 300,00 <sup>c</sup>	15,56 ± 1,99 <sup>c</sup>	2960 ± 143,53 <sup>d</sup>	2340 ± 273,13 <sup>d</sup>
E 5,0 µg/ml	1148 ± 145,96 <sup>d</sup>	1192 ± 239,22 <sup>d</sup>	1228 ± 321,97 <sup>e</sup>	672,50 ± 92,32 <sup>e</sup>
E 10,0 µg/ml	9850 ± 2650 <sup>e</sup>	6400 ± 456,07 <sup>e</sup>	163,33 ± 24,04 <sup>ab</sup>	113,20 ± 16,83 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras diferentes, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )



### 1 – Maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

Oócitos utilizados para estudos de maturação *in vitro* são geralmente colhidos de folículos antrais de 2-8 mm de diâmetro e são capazes de completar o crescimento e adquirir competência para maturação, fertilização e posterior desenvolvimento. A dinâmica da maturação oocitária pode ser afetada pelas condições de cultura e, normalmente, a progressão nuclear ocorre mais rapidamente em condições sub-ótimas de cultura (Yang, 1997). O meio de cultura mais amplamente utilizado para cultura de embriões é o TCM199 suplementado com soro bovino e hormônios e uma grande variedade de sistemas de cultura também utiliza co-cultivo de células epiteliais do oviduto e/ou células da granulosa (Aoyagi et al., 1990). Quando incluso no folículo ovariano, o oócito é acoplado metabolicamente às células foliculares através das *gap junctions* (Anderson & Albertini, 1976), que permitem a transferência direta de mensageiros das células somáticas para o oócito. Quando removidos dos folículos e cultivados em meio simples de cultura, os oócitos podem retomar a primeira divisão meiótica (Edwards, 1965), pois a perda de contato físico entre COCs e células da granulosa murais retira o sinal inibitório que mantém o bloqueio da meiose (Racowsky & Baldwin, 1989). Este contato físico tem um papel importante no controle da maturação do oócito, pois a adição de células do *cumulus* não afeta a capacidade de desenvolvimento de oócitos desnudos, mesmo quando adicionadas na mesma densidade daquelas presentes nos COCs (Hashimoto et al., 1998). No presente experimento, a remoção dos COCs dos folículos permitiu a retomada da meiose após cultivo *in vitro* e, de acordo com Hashimoto et al. (1998), a adição de células da granulosa na concentração de 2,5 a 3,0 x 10<sup>6</sup> por placa de cultura (0,6 x 10<sup>6</sup> / ml) não afetou a progressão da meiose, uma vez que as comunicações celulares entre as células da granulosa adicionadas e as células do *cumulus* dos COCs já haviam sido quebradas. Além de controlar o bloqueio da meiose, as comunicações intercelulares são importantes para a maturação do oócito, pois a eliminação de células da corona radiata e do *cumulus* de COCs anteriormente à maturação, diminui a taxa de penetração do espermatozóide (Zhang et al., 1995). A adição de células do *cumulus* numa densidade

de 1,6 a 3,2 x 10<sup>6</sup> células/ml durante a maturação do oócito é essencial para a aquisição da competência de desenvolvimento de oócitos inclusos na corona, sugerindo que as células do *cumulus* secretam fatores solúveis e/ou removem fatores inibitórios que suprimem o desenvolvimento do oócito (Hashimoto et al., 1998). Por outro lado, a presença de células da granulosa na cultura não afeta a taxa de oócitos que atingem M II (Hashimoto et al., 1998). O efeito das células do *cumulus* na maturação oocitária é semelhante ao efeito das células da granulosa (Mochizuki et al., 1991; Hashimoto et al., 1998), muito embora diferenças entre ambas tenham sido reportadas baseadas em observações morfológicas (Zoller, 1984), padrão de secreção de proteínas (Haghigat et al., 1990) e aromatase imunoreativa (Zhong et al., 1989).

A suplementação do meio de cultura com soro bovino melhora as condições da cultura, proporcionando um ambiente superior para a maturação de oócitos bovinos (Sanbuissho & Threlfall, 1988). O soro é um produto biológico indefinido composto de substâncias ativas como aminoácidos, substratos energéticos, vitaminas, peptídeos, proteínas, hormônios, fatores de crescimento e outros (Keskintepe et al., 1995; Pinyopummintr & Bavister, 1994). A suplementação do meio de cultura com fatores de crescimento, na ausência de soro, não melhora o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos (Wang et al., 1997), indicando que as substâncias presentes no soro agem de uma maneira integrada e sinérgica. É possível que os hormônios presentes no soro tenham um papel importante na maturação nuclear e citoplasmática, uma vez que meios de maturação contendo hormônios, com ou sem soro fetal bovino, aumentam a frequência de fertilização e desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Saeki *et al.*, 1991). Entretanto, o mecanismo preciso dos efeitos de esteróides na maturação oocitária, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, permanece desconhecido.

No presente estudo, verificou-se que a adição de soro ao meio de cultura para MIV não influenciou a conclusão da maturação nuclear, que ocorreu normalmente inclusive na ausência de soro bovino. A única diferença observada foi entre os grupos SFB+SVP e SFB+SVE, sendo que este último proporcionou a maior taxa de oócitos que atingiram M II. Desta maneira, verificou-se que a variação dos componentes séricos, de acordo com o status fisiológico da vaca, influenciou a MIV de oócitos bovinos e o soro de vaca no estro demonstrou ser o melhor como suplemento do meio de cultura. De acordo com Wang et al. (1997), não se verifica diferença significativa entre a

suplementação do meio com SFB ou BSA antes da clivagem, mas o SFB atua melhorando o desenvolvimento do embrião pós-clivagem, estimulando o desenvolvimento de blastocistos e a eclosão. Desta maneira, contrariamente aos dados de literatura, este trabalho demonstrou que o efeito benéfico do soro pode ser evidenciado inclusive no processo de na maturação.

As substâncias presentes no soro que permitem a aquisição da competência de desenvolvimento do oócito não foram identificadas neste trabalho, mas pôde-se verificar que atuaram no processo de maturação. Não foi verificada diferença entre a maturação para os oócitos cultivados em meio suplementado com soro bovino ou em meio sem suplementação sérica, mas verificou-se que a maturação de oócitos cultivados em meio suplementado com SFB+SVE foi melhor, diferindo significativamente daqueles cultivados em meio suplementado com SFB+SVP. Assim sendo, parece que a adição de soro de vaca no estro proporcionou um ambiente melhor para a aquisição da capacidade de desenvolvimento do oócito.

Apesar deste estudo ter demonstrado que a adição de soro de vaca ao meio de cultura e a presença de células da granulosa durante a MIV são benéficas para o desenvolvimento maturacional adequado do oócito, pouco se pode assegurar sobre o aspecto sanitário dos embriões produzidos nestes sistemas e sobre a repetibilidade dos resultados (Keskintepe & Brackett, 1996). Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram que a utilização de células da granulosa para co-cultura de oócitos bovinos implicou numa perda de repetibilidade dos resultados bastante acentuada, pois apesar do folículo doador de células da granulosa ter sido classificado de acordo com a coloração, tamanho e aspecto do oócito, nada se sabia a respeito do status deste folículo no ovário (folículo dominante ou subordinado) e nem a respeito dos hormônios e outros vários fatores presentes na composição do fluido folicular (Mingoti et al., 1995). Desta maneira, tem sido crescente o desenvolvimento de sistemas de cultivo para produção de embriões em meio definido. Com o objetivo de se retirar tais variáveis do sistema de cultivo, foram conduzidos outros experimentos onde se excluiu o co-cultivo com células da granulosa e o soro bovino, substituindo-o por BSA como fonte de proteína. Para se verificar as ações sobre a MIV dos hormônios esteróides que estão normalmente presentes no soro, a progesterona, a testosterona e o estradiol foram adicionados ao meio em doses crescente e conhecidas.

O BSA é um suplemento protéico do meio de cultura amplamente utilizado. Muito embora tenha sido verificado que a albumina na cultura de embriões pode promover alguns efeitos indesejados (Bavister, 1995), ela tem alta capacidade de reservar certos componentes benéficos, como esteróides, vitaminas, ácidos graxos, colesterol e também transportar íons e pequenas moléculas (Maurer, 1992). Contrariamente ao demonstrado por Leibfried-Rutledge et al. (1986), o presente estudo demonstrou que a substituição do SFB pelo BSA como suplemento protéico do meio de cultura não influenciou a maturação nuclear de oócitos bovinos cultivados *in vitro*, indicando que o BSA e/ou os componentes por ele transportados proporcionaram um ambiente adequado onde a progressão meiótica pode transcorrer normalmente. Entretanto, de acordo com a literatura (Maurer, 1992), foi verificado que o BSA contaminou a cultura com baixos níveis de progesterona, testosterona e estradiol, como demonstrado a seguir. Assim sendo, o BSA deve ser substituído por macromoléculas sintéticas, como álcool polivinil (PVA) ou polivinilpirrolidona (PVP) quando se deseja trabalhar com meio quimicamente definido, muito embora se sabe que a obtenção de embriões produzidos em tais meios é substancialmente menor do que aquela em meio suplementado com BSA e, principalmente, soro bovino (Thompson, 1999). A albumina é a proteína prevalente no trato reprodutivo de mamíferos e evidências em camundongos sugerem que a albumina pode exercer função intracelular, além das funções exógenas que já acredita-se exercer (Dunglison et al., 1995). Foi verificado que o volume total de proteína foi menor em blastocistos provenientes de culturas em meios contendo PVA do que os cultivados em meios contendo BSA ou SFB (Thompson, 1999). Desta maneira, os embriões derivados de meios com PVA estão mais suscetíveis a divergir do perfil de metabolismo *in vivo* que embriões cultivados *in vitro* na presença da albumina (Thompson, 1999). Porém, deve-se considerar a importância de um meio quimicamente definido para se estudar o papel das substâncias, inclusive hormônios esteróides, sobre a maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Estes experimentos encontram-se em andamento em nosso laboratório.

A única diferença verificada entre a maturação de oócitos bovinos em meio suplementado com SFB ou BSA foi com relação à expansão do *cumulus* após o período de 24 horas de cultivo *in vitro*, o que vai de acordo com Leibfried-Rutledge et al. (1986). O BSA não proporcionou condições de cultura para uma expansão acentuada

como a verificada em oócitos maturados na presença de soro bovino e também não se observou aderência entre os COCs cultivados numa mesma placa, como se observa em culturas onde o soro está presente. Por outro lado, não se notou diferença entre ambos os suplementos com relação à progressão da maturação nuclear, indicando que a expansão do *cumulus* não é essencial para a conclusão da maturação meiótica, como se acreditava recentemente. A menor expansão do *cumulus* em meio suplementado com BSA ocorreu mesmo na presença de FSH e hCG. A função do FSH consiste em induzir as células do *cumulus* a secretar uma substância que atua paracrinamente, ativando a meiose, mesmo em oócitos desnudos (Byskov et al., 1997). O contato íntimo entre células do *cumulus* e oócito não é essencial para a retomada da meiose, mas é necessário para a produção inicial desta substância ativadora da meiose pelas células do *cumulus* (Byskov et al., 1997).

A ação da progesterona na maturação do oócito não está bem estabelecida (Vanderhyden et al., 1993). No folículo *in vivo*, há elevação dos níveis de progesterona nos momentos próximos à ovulação, quando a maturação do oócito está completa ou quase completa. Assim sendo, estima-se que a progesterona não interfere com a retomada da meiose (Smith & Tenney, 1980). Quando presente na cultura para maturação *in vitro* de oócitos bovinos, a progesterona, nas concentrações utilizadas neste experimento, atrasou a progressão da meiose do estágio de M I para T I as 16 horas de cultivo, mas não impediu a conclusão da mesma ao final da cultura, exceto quando presente na concentração de 2,5 µg/ml, que foi potencialmente inibitória. Resultados de Kaji et al. (1987) demonstraram que a maturação de oócitos incubados em meio contendo progesterona a 2,0 µg/ml foi similar à do grupo controle, mas foi verificado um significativo atraso durante as primeiras horas de cultura, como demonstrado por este trabalho. De acordo com os autores, a inibição da maturação oocitária pela progesterona é resultado de sua ação inibitória sobre a atividade da fosfodiesterase (PDE) no oócito. O cAMP mantém o bloqueio da meiose ao ativar uma proteína-quinase dependente de cAMP (Bornslaeger et al., 1986) e a PDE é responsável, pelo menos em parte, pela diminuição dos níveis de cAMP do oócito que precede a maturação.

A testosterona também atua inibindo a atividade PDE no oócito, causando inibição da maturação meiótica de uma maneira dose-dependente (Kaji et al., 1987), tal

como observado neste trabalho. Além de ocasionar um atraso da progressão da meiose do estágio de M I para T I as 16 horas de cultivo, a testosterona também atuou impedindo a conclusão da meiose no final da cultura, especialmente quando presente na concentração de 10 µg/ml. De acordo com nossos resultados e com a literatura consultada, a presença da testosterona na cultura *in vitro* permite a GVBD, mas aumenta a porcentagem de oócitos que não concluem a maturação meiótica, sem entretanto aumentar a incidência de degeneração (Smith & Tenney, 1980).

A presença do estradiol na cultura para MIV de oócitos bovinos, a semelhança da progesterona e testosterona, dificultou a progressão da meiose de uma maneira dose-dependente. Quanto maior a concentração de estradiol na cultura, menor a porcentagem de oócitos que atingiram M I após 8 horas de cultura e menor a porcentagem de oócitos que atingiram T I após 16 horas de cultura. O efeito dose-resposta foi verificado apenas quando a concentração de estradiol no meio foi de 1,0, 2,5 e 5,0 µg/ml, mas não se pronunciou na concentração de 10,0 µg/ml. De acordo com Kaji et al. (1987), o estradiol também atua inibindo a atividade PDE no oócito, causando inibição da maturação meiótica de uma maneira dose-dependente. O efeito do estradiol consiste em reduzir a incidência de extrusão do corpúsculo polar (M II), causando bloqueio da maturação após a GVBD (Smith & Tenney, 1980).

Muito embora nossos resultados tenham demonstrado que o estradiol causou um retardo no início da cultura sobre a progressão da maturação meiótica de uma maneira dose-dependente, inesperadamente observou-se o oposto após 24 horas de cultivo, ou seja, quanto maior a concentração de estradiol no meio de cultura, maior a tendência dos oócitos a atingirem a fase de M II. Da mesma maneira, o efeito dose-resposta foi verificado apenas quando a concentração de estradiol no meio foi de 1,0, 2,5 e 5,0 µg/ml, mas não se pronunciou na concentração de 10,0 µg/ml. Os resultados indicaram que a ação do estradiol consistiu em retardar a progressão da maturação meiótica no início da cultura, mas parece que este retardo foi benéfico, permitindo que um número maior de oócitos concluísse a maturação nuclear. Provavelmente, este retardo na maturação nuclear provocado pelo estradiol facilitou a sincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática, o que permitiu ao oócito adquirir a competência para seu desenvolvimento. 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., 1994; 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). 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 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).

Os resultados demonstraram que a ação do estradiol consistiu em beneficiar a conclusão da maturação meiótica no final do cultivo para MIV de oócitos bovinos, de uma maneira dose-dependente. Entretanto, faz-se necessário afirmar que não se verificou diferença estatística quando comparou-se a conclusão da maturação nuclear de oócitos maturados em meio suplementado com estradiol ou de oócitos maturados em meio suplementado com BSA ou SFB. Assim sendo, os resultados nos levam a questionar a necessidade da suplementação do meio de cultura com estradiol, como vem sendo amplamente utilizado nos sistemas de cultivo para MIV de oócitos de bovinos, ainda porque as células do *cumulus* dos COCs são capazes de secretar estradiol na cultura, como mostrado a seguir.

## *2 – Atividade esteroideogênica das células da granulosa e das células do cumulus em cultura para maturação in vitro de oócitos bovinos.*

As células foliculares contribuem de várias maneiras para o desenvolvimento do oócito. Providenciam nutrientes para o seu crescimento e, mais tardiamente, controlam a maturação nuclear e citoplasmática do oócito incluso no folículo selecionado para ovulação e contribuem para a atresia e degeneração do oócito incluso em folículo não ovulatório. Estas ações ocorrem via alteração do microambiente do folículo, provocado pela secreção de produtos das células foliculares no fluido folicular. Em adição, células foliculares especializadas (células do *cumulus*) acoplam-se metabolicamente ao oócito através das *gap junctions* e, desta maneira, fornecem nutrientes e moléculas regulatórias diretamente ao ooplasma.

Os produtos secretórios das células foliculares mais bem caracterizados são os hormônios esteróides. Os dois tipos celulares envolvidos na esteroidogênese folicular são: (1) células secretoras responsivas ao LH, compreendendo as células da teca interna do envelope folicular e as células intersticiais do estroma ovariano e (2) células responsivas ao FSH, compreendendo exclusivamente as células da granulosa, as quais também adquirem a habilidade de responder ao LH tardiamente na maturação folicular.

Os hormônios esteróides são classificados com base em sua principal função biológica em 3 classes maiores: progestágenos, andrógenos e estrógenos. Fisiologicamente, os estrógenos (estrona e  $17\beta$ -estradiol) são os esteróides foliculares mais importantes. A androstenediona e a testosterona são encontradas no fluido folicular (Short, 1960) e são os precursores aromatizáveis imediatos dos estrógenos (estrona e  $17\beta$ -estradiol, respectivamente). O produto  $C_{21}$  mais abundante produzido no folículo é a progesterona (pregn-4-ene-3,20-dione), produzida como intermediário biossintético por folículos em todos os estágios do desenvolvimento e como produto secretório final nos períodos peri e pós-ovulatório (Gore-Langton & Armstrong, 1988).

A função esteroidogênica das células da granulosa consiste da metabolização dos andrógenos em estrógenos e da síntese *de novo* de progesterona e seus  $C_{21}$  metabólitos. A regulação da aromatização de andrógenos nas células da granulosa parece estar sob controle do FSH (Dorrington et al., 1975), porém a biossíntese de estrógenos requer o substrato andrógeno para a reação.

De acordo com os resultados do presente trabalho e de resultados prévios em nosso laboratório (Mingoti et al., 1995), verificou-se que as células da granulosa co-cultivadas com oócitos bovinos maturados *in vitro* são capazes de secretar progesterona. Entretanto, esta secreção depende de estímulos, pois não se observou variação nos níveis de progesterona no meio de cultura que não recebeu suplementação sérica. A adição de soro bovino ao meio de cultura estimulou estas células, que passaram a secretar progesterona no final do cultivo, quando as células provavelmente tenham se luteinizado. Muito embora a luteinização ocorra normalmente apenas no estágio pré-ovulatório de desenvolvimento folicular, foi demonstrado que as células da granulosa removidas do folículo anteriormente ao pico de LH podem espontaneamente adquirir as características das células diferenciadas pelo LH, incluindo um aumento da expressão de receptores de LH e habilidade de secretar progesterona (Hillensjo et al., 1981). A



origem da substância inibidora da luteinização no fluido folicular é incerta, mas inúmeros estudos sugerem que o oócito secreta um fator que tem atividade similar (Vanderhyden et al., 1993).

A biossíntese de progesterona *in vivo* ocorre inicialmente em resposta ao estímulo por FSH, sendo posteriormente elevada pelo estímulo por LH, obviamente, após a diferenciação dos receptores. Em diversas espécies estudadas, o maior estímulo à secreção de progesterona segue-se ao pico de LH, havendo apenas uma queda transiente na sua produção no momento em que as células da granulosa se diferenciam, formando células granulosa luteinizadas (Gore-Langton & Armstrong, 1988). Apesar de não ter sido determinado no presente estudo, parece que o soro sanguíneo forneceu tanto precursores da via esteroidogênica, como alguns fatores estimulatórios às células da granulosa. Estes fatores podem ser as gonadotrofinas (FSH e LH), já que a biossíntese de progesterona possui uma reação limitante regulada pela ação do LH nas células da granulosa e que consiste da quebra da cadeia lateral do colesterol (Jones & Hsueh, 1982). Ainda, outros hormônios presentes no soro sanguíneo, tais como insulina, hormônio do crescimento (GH), fator de crescimento da insulina (IGF-I), têm demonstrado ser fundamentais como suplementos da cultura de células da granulosa *in vitro*, a medida que ativam a proliferação das células da granulosa, assim como estimulam sua atividade biossintética, passando a secretar progesterona e estradiol (Spicer et al., 1993).

Uma vez que a testosterona é um produto biossintetizado pelas células da teca, as quais não estavam presentes na cultura, não se verificou alteração dos seus níveis durante o co-cultivo de células da granulosa com oócitos bovinos. Entretanto, notou-se que o soro bovino adicionado à cultura foi capaz de fornecer testosterona ao meio, que serviu de substrato para aromatização em estradiol pelas células da granulosa, a partir de seis horas de cultura. A atividade esteroidogênica das células da granulosa requer o fornecimento de precursores (andrógenos) e a aromatização parece estar sob controle do FSH (Dorrington et al., 1975). Assim sendo, pode-se supor que a suplementação da cultura com soro de vaca nos diferentes estágios do ciclo estral é importante ao fornecer precursores para a reação de aromatização e também fatores e/ou hormônios estimuladores da atividade esteroidogênica pelas células da granulosa. Entre os hormônios estimuladores da biossíntese de estradiol pelas células da granulosa incluem-

se a insulina e o IGF-I, que estimulam células derivadas de folículos pequenos e de folículos grandes, respectivamente (Spicer et al., 1993). Entretanto, a despeito de diferentes respostas celulares ao estímulo hormonal, os autores comprovaram que as células originárias de folículos grandes apresentam uma maior capacidade de produzir estradiol do que células originárias de folículos pequenos e que, para ambas as células, a esteroidogênese só ocorre na presença de FSH. Desta maneira, este trabalho vai de acordo com os autores, pois verificou-se que as células da granulosa necessitam de estímulo para secreção de  $17\beta$ -estradiol, o que foi conseguido pela suplementação do meio com soros de vaca nas diferentes fases do ciclo estral.

Por outro lado, apesar do SFB e SFB+SVE fornecerem à cultura os maiores níveis de  $17\beta$ -estradiol determinado por este trabalho, não se demonstraram ser eficientes em estimular a biossíntese adicional de  $17\beta$ -estradiol, apesar do fato de que as concentrações de testosterona mantiveram-se elevadas na cultura, independentemente do soro sanguíneo utilizado como suplemento. Assim sendo, este trabalho demonstrou que para a secreção de estradiol em cultivo *in vitro*, as células da granulosa necessitam de outros fatores estimuladores da esteroidogênese em concentrações adequadas, além do precursor aromatizável.

Um experimento clássico da literatura é a demonstração da biossíntese de esteróides pelas células ovarianas, que segue o modelo duas células - dois hormônios, onde as células da teca estimuladas por LH produzem andrógenos aromatizáveis e as células da granulosa, em resposta ao estímulo por FSH, possuindo intensa atividade aromatase, sintetizam estrógenos sem uma produção *de novo* de substratos  $C_{19}$ -esteróides (Gore-Langton & Armstrong, 1988). Desta maneira, não se observou síntese de testosterona neste experimento, uma vez que não se cultivou células da teca juntamente com os COCs. A adição de testosterona ao meio de cultura objetivou analisar seu efeito sobre a MIV e FIV de oócitos bovinos e seu efeito sobre a produção de progesterona e estradiol pelas células do *cumulus*.

Muito embora a esteroidogênese seja predominantemente uma função das células granulosas murais, a habilidade das células do *cumulus* em produzir progesterona foi demonstrada em algumas espécies, incluindo ratos (Sherizly et al., 1980), suínos (Channing et al., 1981), humanos (Hillensjo et al., 1985) e bovinos (presente trabalho). A secreção de progesterona pelas células do *cumulus* dos COCs

cultivados para MIV foi estimulada principalmente pela suplementação do meio de cultura com BSA, SFB e estradiol. Nossos resultados corroboram com dados de Rodway et al. (1999), que verificaram estimulação à síntese de progesterona por uma linhagem de células da granulosa de suíno (JC-410) cultivada na presença de 17 $\beta$ -estradiol. De acordo com Rodway et al. (1999), a progesterona tem um efeito regulador autócrino, controlando sua própria síntese pelas células da granulosa, mas neste trabalho se observou que este efeito foi inibitório, uma vez que houve bloqueio de sua própria síntese. O efeito estimulatório da testosterona também não foi observado, pois apesar de ter havido uma elevação dos níveis de progesterona após 24 horas de cultura, não foi estatisticamente significativo. Segundo Rodway et al. (1999), o efeito dos andrógenos parece ser mediado pela expressão do gene P450scc, enquanto os progestágenos estimulam a expressão tanto do gene P450scc quanto do 3 $\beta$ -HSD.

A secreção de progesterona por células granulosa em estímulo ao estradiol já havia sido anteriormente reportada, mas este trabalho demonstrou que as células do *cumulus* também possuem esta habilidade. Estudos de Schomberg et al. (1976) demonstraram um aumento no acúmulo de progesterona em células da granulosa de suínos cultivadas com 5- $\alpha$ -dihidrotestosterona e também Armstrong & Dorrington (1976) reportaram o efeito sinérgico dos andrógenos na ação esteroidogênica do FSH sobre células da granulosa de ratos. O papel do estradiol no controle da produção de progesterona difere daquele da androstenediona. Goldenberg et al. (1972) observaram um efeito estimulatório do 17 $\beta$ -estradiol na síntese de progesterona por células da granulosa de ratos, provavelmente atuando junto com o FSH na indução de receptores de LH (Gengenbach & Hansel, 1975).

Nossos resultados demonstraram que quando o meio de cultura foi suplementado com estradiol, houve secreção de progesterona pelas células do *cumulus* a partir de 16 horas de cultura (10 COCs cultivados por placa), em contraste com os experimentos de esteroidogênese por células da granulosa em meio suplementado com soro bovino, onde o nível de progesterona aumentou apenas no final do cultivo (45 COCs cultivados por placa). Muito embora não sejam possíveis comparações entre ambos os experimentos, face à diferente metodologia empregada, os resultados são interessantes no sentido de que quanto menor é o número de COCs em cultura, mais rapidamente as células da granulosa e/ou *cumulus* passam a secretar progesterona. De acordo com Vanderhyden &

MacDonald (1998), a produção de esteróides pelas células da granulosa é modulada pelo oócito, que produz um fator inibitório que altera a atividade da enzima  $3\beta$ -HSD, capaz de reduzir a habilidade destas células em produzir e/ou acumular progesterona, mesmo em abundância de substrato. Porém, a responsividade das células do *cumulus* a este fator declina durante a luteinização. Desta maneira, o número maior de oócitos em cultura parece ter inibido a produção precoce de progesterona pelas células da granulosa e/ou *cumulus*. Obviamente neste caso, devido ao número maior de COCs cultivados e adição de células da granulosa murais, a produção final de progesterona foi muito maior.

Nossos resultados demonstraram que as células do *cumulus* dos COCs são capazes de secretar estradiol quando cultivadas em meio suplementado com BSA, progesterona e testosterona e foi possível verificar o aumento dos níveis de estradiol a partir de 8 horas de cultura. De acordo com Vanderhyden & MacDonald (1998), a secreção de estradiol pelas células da granulosa é regulada por fatores secretados pelo oócito, que agem alterando a abundância ou a atividade de enzimas da via esteroidogênica, tal como aromatase. Nos experimentos onde se adicionou soro bovino ao meio de cultura, poderia-se atribuir o estímulo à secreção de estradiol pelas várias substâncias encontradas no soro, como gonadotrofinas, fatores de crescimento, precursores, dentre outras. Todavia, na ausência de soro bovino neste experimento, os resultados parecem estar de acordo com os dados de Vanderhyden & MacDonald (1998), atribuindo-se o efeito estimulador da secreção de estradiol ao próprio oócito. Entretanto, novos estudos serão necessários para se atribuir este efeito à alteração na abundância das enzimas envolvidas na via esteroidogênica.

De acordo com nossos resultados, verificou-se que o BSA estimulou fortemente a produção de estradiol pelas células do *cumulus*. Quando estas células foram cultivadas em meio suplementado com BSA mais progesterona ou testosterona, também se verificou uma produção significativa de estradiol, mas o acúmulo de estradiol foi muito maior no meio suplementado apenas com BSA. Portanto, a adição de progesterona ou testosterona ao meio de cultura diminuiu a produção de estradiol pelas células do *cumulus* em resposta ao BSA. Assim sendo, este trabalho demonstrou que o BSA estimulou a esteroidogênese das células do *cumulus* dos COCs em cultura para MIV, as quais se demonstraram capazes de secretar progesterona e estradiol. Com relação ao

efeito do estradiol, verificou-se que ele regulou sua própria secreção pelas células do *cumulus* cultivadas *in vitro*, inibindo sua produção e/ou estimulando sua degradação, pois houve um decréscimo significativo deste hormônio no meio após 24 horas de cultura.

Em conclusão, nossos resultados demonstraram que as células da granulosa são estimuladas a produzir progesterona e estradiol quando cultivadas em meio de cultura suplementado com soro bovino, o qual provavelmente lhes forneceu fatores estimuladores da via esteroidogênica e/ou precursores. Verificou-se que as células do *cumulus* também são capazes de secretar progesterona e estradiol em meio suplementado com soro bovino e ainda na ausência de soro bovino, mas na presença de BSA. A porcentagem de oócitos que concluiu a maturação nuclear (atingiu a fase de M II) após 24 horas de cultivo *in vitro* em meio suplementado com BSA ou SFB foi similar. Desta maneira, este trabalho demonstrou ser possível a substituição do soro bovino pelo BSA, como fonte de macromoléculas para o meio de cultura de COCs bovinos. Também se demonstrou ser desnecessária a adição de células da granulosa para co-cultivo com COCs, uma vez que as células do *cumulus* também são capazes de secretar esteróides, os quais parecem atuar no processo de maturação nuclear dos oócitos bovinos.

## Conclusões

---

### *Maturação in vitro de oócitos bovinos*

1 – A adição de células da granulosa na concentração de  $0,6 \times 10^6$  / ml à cultura de MIV de COCs bovinos não afetou a progressão da meiose.

2 – A adição de soro ao meio de cultura para MIV não influenciou a progressão da maturação nuclear até a fase de M II, que ocorreu normalmente mesmo na ausência de soro bovino.

3 – A substituição do SFB pelo BSA como suplemento protéico do meio de cultura não influenciou a maturação nuclear de oócitos bovinos maturados *in vitro*.

4 - A substituição do SFB pelo BSA como suplemento protéico do meio de cultura diminuiu a expansão das células do *cumulus* durante o período de 24 horas de cultivo, assim como a aderência entre os COCs cultivados. Uma vez que não se verificou diferença entre ambos os suplementos com relação à maturação nuclear, postula-se que a expansão do *cumulus* não seja essencial para que a maturação progrida até a fase de M II, como se acredita atualmente.

5 – Quando presente na cultura para MIV de oócitos bovinos, a progesterona promoveu um atraso da progressão da meiose do estágio de M I para T I as 16 horas de cultivo, mas não impediu que os oócitos atingissem o estágio de M II ao final do cultivo, exceto quando na concentração de 2,5 µg/ml, que foi potencialmente inibitória.

6 – Além de ocasionar um atraso na progressão da meiose do estágio de M I para T I as 16 horas de cultivo, a testosterona também atuou impedindo que os oócitos atingissem o estágio de M II ao final do cultivo, especialmente quando presente na concentração de 10,0 µg/ml.

7 – Quando comparou-se a progressão da maturação nuclear de oócitos maturados em concentrações crescentes de estradiol, verificou-se que o mesmo dificultou a progressão da meiose, promovendo um atraso da progressão do estágio de GV para o estágio de M I após 8 horas de cultura e daí para o estágio de T I após 16 horas de cultura. Este efeito foi revertido no final da cultura, quando se verificou que quanto maior a concentração de estradiol no meio, maior a tendência dos oócitos atingirem a fase de M II.

8 – Não se verificou diferença significativa quando comparou-se a progressão da maturação nuclear até o estágio de M II de oócitos cultivados em meio suplementado com BSA e estradiol em concentrações crescentes e de oócitos cultivados em meio suplementado com BSA ou SFB. Devido a este resultado, questionamos a necessidade da suplementação do meio de cultura com estradiol da maneira como é feita atualmente, ainda por que este trabalho demonstrou que as células do *cumulus* são capazes de secretar estradiol no meio durante as 24 horas de cultura.

*Esteroidogênese por células da granulosa e/ou do cumulus oophorus*

9 – A adição de células da granulosa ao meio de cultura promoveu imediatamente a elevação dos níveis de progesterona, testosterona e estradiol ao meio de cultura, indicando que estas células possivelmente possuem estoques endógenos destes hormônios, liberando-os para o meio.

10 – As células da granulosa co-cultivadas com COCs bovinos foram capazes de secretar progesterona quando devidamente estimuladas por soro bovino. A secreção ocorreu tardiamente na cultura (observada as 24 horas de cultivo), quando as células provavelmente se luteinizaram.

11 – A adição de soro bovino ao meio de cultura forneceu a testosterona, que foi utilizada como precursor para a aromatização em estradiol pelas células da granulosa co-cultivadas com COCs bovinos. A secreção se deu após 6 horas de cultura.

12 – Foi demonstrado neste trabalho que, além das células da granulosa, as células do *cumulus* dos COCs também foram capazes de secretar progesterona e estradiol. A secreção de progesterona pelas células do *cumulus* foi estimulada principalmente pela suplementação do meio de cultura com BSA, SFB e estradiol. A secreção iniciou-se a partir de 16 horas de cultura.

13 – Quanto menos óocitos estão presentes na cultura para MIV, mais rapidamente as células do *cumulus* e/ou granulosa se luteinizaram, passando a secretar progesterona.

14 – As células do *cumulus* foram estimuladas a secretar estradiol quando cultivadas na presença de BSA, progesterona e testosterona. Porém, o estradiol pareceu agir inibindo sua própria produção pelas células do *cumulus* ou mesmo estimulando sua degradação.



## **Abstract**

---

This study has demonstrated that culture medium supplementation with cycling cow serum and/or FCS, granulosa cells or BSA did not affect meiosis progression from GV to M II stage of bovine oocytes matured *in vitro*. Progesterone impaired meiosis resumption, but it was reverted after 24 hours of culture, except in the concentration of 2,5 µg/ml. Testosterone impaired meiosis resumption and meiosis progression to M II. Estradiol impaired meiosis progression, but it was reverted at the end of the culture, when it was observed that the higher the estradiol concentration in the medium, the higher the number of oocytes reaching M II. However, when IVM of bovine oocytes matured in medium supplemented with only BSA was compared to IVM of bovine oocytes matured in medium supplemented with BSA plus estradiol, no statistical difference was found. Data showed that granulosa cells and/or *cumulus* cells were able to produce progesterone and estradiol in the culture medium, when stimulated by bovine serum. *Cumulus* cells were able to produce progesterone when stimulated by BSA, FCS and estradiol and were still able to produce estradiol when stimulated by BSA, progesterone and testosterone. This study has demonstrated that IVM of bovine oocytes can proceed normally in the absence of bovine serum and granulosa cells, and has additionally demonstrated that the medium supplementation with estradiol did not affect nuclear maturation and it is still not necessary, once *cumulus* cells are able to produce it during the 24 hours of culture.

## Referências Bibliográficas

---

- Anderson E, Albertini DF. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J. Cell Biol.* 1976; 71:680-686.
- Aoyagi Y, Fukui Y, Iwazumi Y, Urakawa M, Ono H. Effects of culture systems on development of in vitro fertilized bovine ova into blastocyst. *Theriogenology* 1989; 31:105-114.
- Armstrong DT & Dorrington JH. Androgens augment FSH-induced progesterone secretion by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1976; 99:1411-1414.
- Baker TG. Electron microscopy of the primary and secondary oocyte. *Advances in the Biosciences* 1971; 6:7-23.
- Baker T. Oogenesis and ovarian development. In: *Reproductive Biology*, edited by Balin and Glasser 1972; pp. 398-437. Excerpta Medica, Amsterdam.
- Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. In: *Reproduction Update* 1995; Vol 1(2). Oxford University Press, New York, pp. 91-148.
- Bèlanger A, Caron S, Picard V. Simultaneous radioimmunoassay of progestins, androgens and estrogens in rat tests. *J. Steroid. Biochem.* 1980; 13: 185 - 190.
- Bornslaeger EA, Mattei P, Schultz RM. Involvement of cAMP - dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. *Dev. Biol.* 1986; 114: 453 - 462.
- Brower AM, Schultz RM. Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: existence and possible nutritional role during oocyte growth. *Develop. Biol.* 1982; 90:114-153.
- Byskov AG, Andersen CY, Hossaini A, Guoliang X. Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulated with FSH. *Molecular Reproduction and Development* 1997; 46:296-305.
- Byskov AG, Yding Andersen C, Nordholm L, Hillensjo T, Thogersen H, Guoliang X, Wassmann O, Andersen JV, Guddal E, Roed T. Chemical structure of sterols that activate oocyte maturation. *Nature* 1995; 374:559-562.

- Catt JW. Department of Scientific and Industrial Research, Palmerston North, New Zealand. Comunicação pessoal, 1990.
- Channing CP, Bae IH, Stone SL, Anderson LD, Edelson S, Fowler SC. Porcine granulosa and cumulus cell properties. LH/hCG receptors, ability to secrete progesterone and ability to respond to LH. *Mol. Cell Endocrinol.* 1981; 22:359-370.
- De Loss FAM, Zeinstra E, Bevers MM. Follicular wall maintains meiotic arrest in bovine oocytes cultured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 1994; 39:162-165.
- Dorrington JH, Moon YS, Armstrong DT. Estradiol - 17 $\beta$  biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats; stimulation by follicle - stimulating hormone. *Endocrinology* 1975; 97: 1328 - 1331.
- Downs SM, Daniel SAJ, Eppig JJ. Induction of maturation in cumulus-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *J. Exp. Zoology* 1988; 245:86-98.
- Dunglison GF, Jane SD, McCaul TF, Chad JE, Fleming TP, Kaye PL. Stimulation of endocytosis in mouse blastocysts by insulin: a quantitative morphological analysis. *J. Reprod. Fert.* 1995; 105:115-123.
- Edwards RG. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 1965; 208:349-351.
- Eppig J. Role of serum in FSH stimulated cumulus expansion by mouse oocyte-cumulus cell complexes in vitro. *Biol. Reprod.* 1980; 22:629-633.
- Eppig JJ. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *BioEssays* 1991; 13:569-574.
- Eppig JJ, Downs SM. The effect of hypoxanthine on mouse oocyte growth and development in vitro: maintenance of meiotic arrest and gonadotropin induced oocyte maturation. *Dev. Biol.* 1987; 119:313-321.
- Erickson BH. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* 1966a, 10:97105.
- Erickson BH. Development and senescence of the postnatal ovary. *Journal of Animal Science* 1966b, 25:800-805.
- Fagbohun CF, Downs SM. Requirement for glucose in ligand-stimulated meiotic maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *J. Reprod. Fert.* 1992; 96:681-697.

- Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol. Reprod. Dev.* 1995; 42:437-442.
- Flood MR, Gage TL, Bunch TD. Effect of various growth-promoting factors on preimplantation bovine embryo development in vitro. *Theriogenology* 1993; 39(4):823-833.
- Foote WD, Thibault C. Recherches expérimentales sur la maturation in vitro des ovocytes de truie et de veau. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys* 1969; 3:329-349.
- Gengenbach DC, Hansel W. Estradiol induced changes in midcycle heifers. *Amer. Soc. Anim. Abst.* 6714, Annual Meeting 1975; p.353-356.
- Goldenberg RL, Bridson WE, Kohler PO. Estrogen stimulation of progesterone synthesis by porcine granulosa cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1972; 48:101-107.
- Gonçalves PBD, Hernández AG, Schweitzer CM, Carambula SF. Aspects of the oocyte maturation and in vitro fertilization in the bovine. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, supl. 24. Anais da XI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embrião 1996. p. 98-116.
- Gordon I. *Laboratory production of cattle embryos*. Edited by University Press 1994; 639 p., Cambridge.
- Gore-Langton RE, Armstrong DT. Follicular steroidogenesis and its control. In: *Knobil, E., Neill, J. D. The Physiology of reproduction. vol 1, cap.11.* p. 387 - 446. *Raven Press*, New York. 1988.
- Hahigat N, Van Winkle LJ. Developmental change in follicular cell-enhanced amino-acid uptake into mouse oocytes that depends on intact gap junctions and transport system. *Gly. J. Exp. Zool.* 1990; 253:71-82.
- Hammond JM, Samaras SE, Grimes R, Leighton J, Barber J, Canning SF, Guthrie HD. The role of insulin-like growth factors and epidermal growth factor-related peptides in intraovarian regulation in the pig ovary. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 1993; 48:117-125.
- Harper KM, Brackett BG. Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biology of Reproduction* 1993; 48:409-416.

- Hashimoto S, Saeki K, Nagao Y, Minami N, Yamada M, Utsumi K. Effects of cumulus cell density during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 1998; 49:1451-1463.
- Hillensjo T, Bauminger RS, Ahren K. Effect of luteinizing hormone on the pattern of steroid production by preovulatory follicles of pregnant mare's serum gonadotrophin-injected immature rats. *Endocrinology* 1976; 99:996-1002.
- Hillensjo T, Magnusson C, Svensson U, Thelander H. Effect of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone on progesterone synthesis by cultured rat cumulus cells. *Endocrinology* 1981; 108:1920-1924.
- Hillensjo T, Sjogren A, Strander B, Andino N. Steroid secretion by cumulus cells isolated from human preovulatory follicles. *Acta Endocrinol.* 1985; 108:407-413.
- Jones PBC, Hsueh AJW. Pregnenolone biosynthesis by cultured granulosa cells: modulation by follicle - stimulating hormone and gonadotropin - releasing hormone. *Endocrinology* 1982; 111:713 - 721.
- Kaji E, Bornslaeger EA, Schultz RM. Inhibition of mouse oocyte cyclic AMP Phosphodiesterase by Steroid hormones: A Possible Mechanism for Steroid hormone inhibition of oocyte maturation. *The Journal of Exper. Zool.* 1987; 243: 489 - 493.
- Kastrop PMM, Bevers MM, Destrée OHJ, Kruij TAM. Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 1990; 90:305-310.
- Keskintepe L & Brackett BG. In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biology of Reproduction* 1996; 55:333-339.
- Keskintepe L, Burnley CA, Brackett BG. Production of viable bovine blastocysts in defined in vitro conditions. *Biology of Reproduction* 1995; 52:1410-1417.
- Khatir H, Lonergan P, Mermillod P. Kinetics of nuclear maturation and protein profiles of oocytes from prepubertal and adult cattle during in vitro maturation. *Theriogenology* 1998; 50:917-929.
- Kim JH, Niwa K, Lim MJ, Okuda K. Effects of phosphate, energy substrates and amino acids on development of in vitro matured, in vitro fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol. Reprod.* 1993; 48:1320-1325.

- Kruip ThAM, Van Beneden ThH, Dieleman SJ, Bevers MM. The effect of oestradiol-17 $\beta$  on nuclear maturation of bovine oocytes. *Proceedings of the Eleventh International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination* (Dublin) 1988; 3, 336 (3pp.).
- Lawrence TS, Beers WH, Gilula NB. Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. *Nature* 1978; 272:501.
- Le Gal F, Gall L, De Smedt V. Changes in protein synthesis patterns during in vitro maturation of goat oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 1992; 32:1-8.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, First NL. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biology of Reproduction* 1986; 35:850-857.
- Lévesque JT, Sirard MA. Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. *Biol. Reprod* 1996; 55:1427-1436.
- Liebfried ML, First NL. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J. Anim. Sci.* 1979; 48:76-86.
- Loewenstein WR. The cell-to-cell channel of gap junctions. *Cell* 1987; 48:725-726.
- Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC. Role of EGF, IGF-I, sera and cumulus cells on maturation in vitro of bovine oocytes. *Theriogenology* 1995; 44:109-118.
- Marion GB, Gier HT, Choudary JB. Micromorphology of the bovine ovarian follicular system. *Journal of Animal Science* 1968; 27:451-465.
- Maurer HR. 1992. Towards serum-free, chemical defined media for mammalian cell culture. In: Freshney. R.I. (Ed.). *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, 2<sup>nd</sup> ed., Oxford University Press. Oxford. Pp.15-46.
- McNatty KP. Cyclic changes in antral fluid hormone concentrations in humans. *Clin. Endocrin. Metab.* 1978; 7:577-600.
- Mingoti GZ, Garcia JM, Rosa-E-Silva AAM. The effect of serum on in vitro maturation, in vitro fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes co-cultured with granulosa cells. *Braz. Journ. of Medic. And Biol. Research* 1995; 28(2):213-218.
- Mochizuk H, Fukui Y, Ono H. Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 1991; 36:973-986.

- Motlik J, Fulka J. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* 1986; 25:87-96.
- Motlik J, Lie B, Shioya Y. Two sensitivity levels of cattle oocytes to puromycin. *Biol. Reprod.* 1990; 43:994-998.
- Pinyopummintr T, Bavister BD. In vitro-matured/in vitro-fertilized oocytes can develop into morulae/blastocyst in chemically defined, protein-free culture media. *Biol. Reprod.* 1991; 45:736-742.
- Pinyopummintr T, Bavister BD. Development of bovine in cell-free culture medium: Effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology* 1994; 41:1241-1249.
- Racowsky C, Baldwin KV. In vitro and in vivo studies reveal that hamster oocyte meiotic arrest is maintained only transiently by follicular fluid, but persistently by membrane/cumulus granulosa cell contact. *Dev. Biol.* 1989; 134:297-306.
- Rieger D, Luciano AM, Modina S, Pocar P, Lauria A, Gandolfi F. The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 1998; 112:123-130.
- Rodway MR, Swan CL, Crellin NK, Gillio-Meina C, Chedrese PJ. Steroid regulation of progesterone synthesis in a stable porcine granulosa cell line: a role for progestins. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1999;68:173-180.
- Rosa-E-Silva AAM, Caldas MCS, Campos MLA, Gradela A. Padronização e validação de dois métodos de radioimunoensaio (RIE) para dosagem da progesterona (P<sub>4</sub>) no plasma de equinos, bovinos e ratos. *Ars Veterinária* 1993; 9(1):1-9.
- Rosa-E-Silva AAM, Guimarães MA, Azevedo RR, Campos LMA. Setting up and validation of the radioimunoassay methods for determination of plasma, testis and seminal interstitial fluid testosterone concentration. *Ars Veterinária* (no prelo).
- Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge ML, First N L. *In vitro* fertilization and development of bovine oocyte matured in serum - free medium. *Biol. Reprod.* 1991; 44: 256 - 260.
- Salustri A, Petrunaro S, De Felici M, Conti M, Siracusa G. Effect of follicle stimulating hormone on cyclic adenosine monophosphate level and on meiotic

- maturation in mouse cumulus cell-enclosed oocytes cultured in vitro. *Biol. Reprod.* 1985; 33:797-802.
- Sanbuissho A, Threlfall WR. The influence of serum and gonadotropins on bovine oocyte maturation in vitro (abstract). *Theriogenology* 1988; 29:301.
- Schomberg DW, Stouffer RL, Tyrey L. Modulation of progestin secretion in ovarian cells by 17 $\beta$ -hydroxy-5-androstan-3-one (dihydrotestosterone): A direct demonstration on monolayer culture. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 1976; 68:77-81.
- Schroeter D, Meinecke B. Comparative analysis of the polypeptide pattern of cumulus cells during maturation of porcine cumulus oocyte complexes in vivo and in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* 1995; 35:85-94.
- Sherizly I, Kraicer PF. Progesterone secretion by the post-ovulatory rat cumulus oophorus. *Gamete Research* 1980; 3:115-119.
- Short RV. Steroids present in the follicular fluid of the mare. *J. Endocrin.* 1960; 20:147-156.
- Sirard MA, Coenen K, Bilodeau S. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology* 1992; 37:39-58.
- Sirard MA, Coenen K. The co-culture of cumulus-enclosed bovine oocytes and hemisections of follicles: Effects on meiotic resumption. *Theriogenology* 1993; 40:933-942.
- Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First NL. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 1989; 40:1257-1263.
- Sirard MA, Richard F, Mayes M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology* 1998; 49:483-497.
- Smith DM, Tenney DY. Effects of steroids on mouse oocyte maturation in vitro. *J. Reprod. Fert.* 1980; 60:331-338.
- Spicer LJ, Alpizar E, Echternkamp SE. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. *J. Anim. Sci.* 1993; 71:1232-1241.



- Stock AE, Woodruff TK, Smith LC. Effects of inhibin A and activin A during in vitro maturation of bovine oocytes in hormone- and serum-free medium. *Biology of Reproduction* 1997; 56:1559-1564.
- Suss U, Wutrich K, Stranzinger G. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured in vitro. *Biol. Reprod.* 1988; 38:871-880.
- Sutovsky P, Fléchon J, Fléchon B, Motlik J, Peynot N, Chesné P, Heyman Y. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during in vitro culture of cattle oocytes cumulus complexes. *Biol. Reprod* 1993; 49:1277-1287.
- Takahashi Y, First NL. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 1992;37:1101-1110.
- Tatemoto H, Terada T. Time-dependent effects of cycloheximide and alpha-amanitin on meiotic resumption and progression in bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 1995; 43:1107-1113.
- Thompson JG. Cultura in vitro de embriões bovinos: novas técnicas e consequências pós-transferência. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, supl. 27. Anais da XIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embrião 1999. p. 133-146.
- Vanderhyden BC, Cohen JN, Morley P. Mouse oocyte regulate granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology* 1993; 133:423-426.
- Vanderhyden BC, MacDonald EA. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis throughout follicular development. *Biology of Reproduction* 1998; 59:1296-1301.
- Wang S, Liu Y, Holyoak GR, Bunch TD. The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre- and postcleavage-stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M199 media. *Animal Reproduction Science* 1997; 48:37-45.
- Wert SE, Larsen WJ. Meiotic resumption and gap junction modulation in the cultured rat cumulus-oocyte complex. *Gamete Research* 1989; 22:143-162.
- Wiesen JF, Midgley ARJr. Expression of gap junction messenger ribonucleic acid and protein during follicular atresia. *Biol. Reprod.* 1994; 50:336-348.

- Wu B, Ignatz GG, Currie BW, Yang X. Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and cumulus cells during maturation in vitro of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 1996; 45:560-565.
- Yang X. Cellular and molecular regulation of oocyte maturation, activation and fertilization in cattle. In *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, Supl. 25, 1997; 84-92.
- Yang X, Kubota C, Suzuki H, Taneja M, Bols PEJ, Presicce GA. Control of oocyte maturation in cows – biological factors. *Theriogenology* 1998; 49:471-482.
- Zhang L, Blakewood EG, Denniston RS, Godke RA. The effect of insulin on maturation and development of in vitro fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 1991a; 35:301.
- Zhang L, Denniston RS, Godke RA. The effect of insulin on the development of in vitro fertilized porcine oocytes. *Journal of Animal Science* 1991b, 69(Suppl. 1), III.
- Zhang L, Jiang S, Woziak PJ, Yang X, Godke R. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 1995; 40:338-344.
- Zhong C, Ishimura K, Yoshinaga-Hirabayashi T, Fujita H, Kitawaki J, Osawa Y. Immunocytochemical study on the localization of aromatase in the ovary of golden hamster, guinea pig and cow. *Acta Histochem Cytochem* 1989; 22:501-507.
- Zoller LC. A comparison of rat and hamster preovulatory follicles: An examination of differences in morphology and enzyme using qualitative and quantitative analysis. *Anat. Rec.* 1984; 210:279-291.
- Zuelke KA & Brackett BG. Effects of luteinizing hormone on glucose metabolism in cumulus enclosed bovine oocytes matured in vitro. *Biology of Reproduction* 1992; 46(Suppl. 1):117(Abs. 267).
- Zuelke KA & Brackett BG. Increased glutamine metabolism in bovine cumulus cell-enclosed and denuded oocytes after in vitro maturation with luteinizing hormone. *Biology of Reproduction* 1993; 48:815-820.
- Zuelke KA, Keith CH, Brackett BG. LH induction of calcium oscillations in immature bovine oocytes. *Biology of Reproduction* 1991; 44(Suppl.1):141(Abs. 354).