

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**MODULAÇÃO DO REINÍCIO DA MEIOSE DE
OÓCITOS BOVINOS PELO FATOR DE
CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 10,
ANGIOTENSINA II E PROGESTERONA EM SISTEMA
ALTERNATIVO DE CULTIVO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bernardo Garziera Gasperin

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**MODULAÇÃO DO REINÍCIO DA MEIOSE DE OÓCITOS
BOVINOS PELO FATOR DE CRESCIMENTO
FIBROBLÁSTICO 10, ANGIOTENSINA II E
PROGESTERONA EM SISTEMA ALTERNATIVO DE
CULTIVO**

por

Bernardo Garziera Gasperin

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Fisiopatologia da Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Bayard Dias Gonçalves

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**MODULAÇÃO DO REINÍCIO DA MEIOSE DE OÓCITOS BOVINOS
PELO FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 10,
ANGIOTENSINA II E PROGESTERONA EM SISTEMA
ALTERNATIVO DE CULTIVO**

elaborada por
Bernardo Garziera Gasperin

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

João Francisco Coelho de Oliveira, Dr.
(Presidente/Co-orientador)

Luís Fabiano Santos da Costa, Dr. (UNOESC)

Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro, Dr. (EMBRAPA Clima Temperado)

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2009.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Ao meu pai pelo seu companheirismo e contribuição na realização dos meus experimentos e por sempre estar disposto a me ajudar;

Aos que partiram, em especial ao meu avô Mário Antônio Gasperin que me motivou na escolha desta profissão;

Ao Laboratório BioRep por ter me proporcionado o aprendizado das técnicas utilizadas neste trabalho e outras que pretendo utilizar ao longo de minha carreira científica;

Aos estagiários e colegas de pós-graduação que me proporcionaram um ambiente único de amizade e cooperação;

Aos meus orientadores Prof. Paulo Bayard Dias Gonçalves e João Francisco Coelho de Oliveira pelos ensinamentos, amizade, confiança e apoio;

Ao Marcos, Joabel, Monique e Rogério companheiros que não medem esforços para ajudar na execução dos experimentos;

Ao Rogério por transmitir seus conhecimentos com uma humildade ímpar e por ser um exemplo de amizade, seriedade e companheirismo;

Ao Marcos Barreta por compartilhar seu vasto conhecimento sobre a produção *in vitro* de embriões;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e ao CNPq pelo apoio financeiro à pesquisa;

Enfim, a todos que contribuíram e torceram por mim.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

MODULAÇÃO DO REINÍCIO DA MEIOSE DE OÓCITOS BOVINOS PELO FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 10, ANGIOTENSINA II E PROGESTERONA EM SISTEMA ALTERNATIVO DE CULTIVO

Autor: Bernardo Garziera Gasperin

Orientador: Paulo Bayard Dias Gonçalves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2009.

O presente trabalho teve por objetivo averiguar o papel do fator de crescimento fibroblástico 10 (FGF10) no reinício da meiose de oócitos bovinos, utilizando um modelo *in vitro* de co-cultivo de oócitos e células foliculares. Em um primeiro estudo, foi estabelecido um sistema de cultivo capaz de manter a osmolalidade dos meios constante na ausência de óleo. A adição de água entre os poços de placas de cultivo foi eficiente na prevenção da evaporação dos meios sendo uma alternativa na experimentação científica e produção *in vitro* de embriões. Com este sistema, se obteve uma taxa média de 30% de desenvolvimento embrionário, resultado similar ao obtido no sistema convencional (33% blastocistos). Após o estabelecimento do sistema, avaliou-se a participação do FGF10 no reinício da meiose de oócitos bovinos e sua interação com a maturação nuclear induzida por angiotensina II (AngII; 10^{-11} M) e progesterona (100ng mL^{-1}). Todas as concentrações de FGF10 testadas foram eficientes na inibição do reinício da meiose induzido por AngII ($P \leq 0,05$). As maiores taxas de rompimento de vesícula germinativa (RVG) foram observadas na ausência de FGF10 (45,3%). Nas concentrações de 10, 100, e 1000ng mL^{-1} de FGF10, as taxas de RVG foram 30,2, 29,6 e 27%, respectivamente. Após o estabelecimento da dose ideal, foi verificado que a adição de FGF10 (100ng mL^{-1}) ao cultivo de complexos cumulus-oócitos acarretou em diminuição na taxa de reinício da meiose somente na presença de células foliculares e AngII (37,8% e 62,6% de RVG com e sem FGF10, respectivamente; $P \leq 0,05$). A partir dos resultados dos experimentos anteriores, o terceiro experimento foi delineado para testar se o FGF10 é capaz de inibir o reinício da divisão meiótica induzido por progesterona. A adição de FGF10 não afetou a taxa de reinício da meiose induzida pela progesterona (41,1% e 41,7% de RVG com e sem FGF10, respectivamente; $P \geq 0,05$). Entretanto, a adição de indometacina ($10\mu\text{M}$) bloqueou (20,1% de RVG; $P \leq 0,05$) o efeito positivo da progesterona. Este bloqueio demonstra que a progesterona, assim como já foi demonstrado para AngII, utiliza a via das ciclooxygenases para induzir o reinício da meiose e este evento parece não ser regulado pelo FGF10. Os resultados demonstram que o FGF10 interage com as células foliculares para inibir o reinício da meiose estimulado pela AngII mas não pela progesterona.

Palavras-chaves: FGF10; angiotensina II; progesterona; reinício da meiose; oócitos bovinos.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

MODULATION OF MEIOTIC RESUMPTION OF BOVINE OOCYTES BY FIBROBLAST GROWTH FACTOR 10, ANGIOTENSIN II AND PROGESTERONE IN AN ALTERNATIVE CULTURE SYSTEM

Autor: Bernardo Garziera Gasperin

Orientador: Paulo Bayard Dias Gonçalves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2009.

The aim of this study was to evaluate the effect of fibroblast growth factor 10 (FGF10) on bovine oocyte meiotic resumption in an *in vitro* oocyte and follicular cells co-culture system. At first, an oil-free culture system able to maintain a stable osmolality of the medium without the negative interference of the oil was established. The maintenance of osmotic equilibrium confirms that four-well plate with water in the central hole can be a feasible alternative to replace oil for scientific experimentation and embryo culture. The embryo development rate in the alternative system (near 30% blastocyst) was similar to that obtained in the conventional system (33% blastocyst). Afterwards, the role of FGF10 on bovine oocyte meiotic resumption was evaluated in a co-culture of oocytes and follicular cells in the presence of angiotensin II (10^{-11} M AngII). All tested concentrations of FGF10 inhibited the resumption of meiosis induced by AngII ($P \leq 0.05$). The highest germinal vesicle breakdown (GVBD) rate was observed when FGF10 was absent (45.3%). At concentrations of 10, 100, and 1000ng mL⁻¹ FGF10, the rates of GVBD were 30.2, 29.6 and 27%, respectively. In a second experiment, oocytes were co-cultured with follicular hemisections to test if FGF10 (100ng mL⁻¹) acts directly on COCs or through follicular cells to inhibit AngII (10^{-11} M)-induced meiotic resumption. The AngII-induced GVBD (62.6%) was inhibited when FGF10 was added to *in vitro* co-culture system (37.8%; $P \leq 0.05$). However, FGF10 did not affect meiotic resumption of COCs cultured without AngII in the presence or absence of follicular cells. The third experiment tested if FGF10 inhibits progesterone-induced meiotic resumption. The addition of FGF10 did not affect the meiotic resumption rate induced by progesterone (41.1% and 41.7% GVBD with and without FGF10, respectively; $P \geq 0.05$). However, indomethacin (10 μ M) blocked (20.1% GVBD; $P \leq 0.05$) progesterone positive effect suggesting that this steroid, like AngII, acts through cyclooxygenases pathway to induce meiotic resumption. Results show that FGF10 interacts with follicular cells to inhibit AngII but not progesterone-induced meiotic resumption of bovine oocytes.

Key words: FGF10; angiotensin II; progesterone; meiotic resumption; bovine oocytes.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURE 1 - Washing media osmolality in 35mm dishes on a heated plate (39°C) with or without oil overlay..... 40

FIGURE 2 - Effect of controlling water evaporation on cleavage rate (Panel A), blastocyst rate (Panel B) and osmolality of synthetic oviduct fluid medium (Panel C)..... 41

CAPÍTULO 2

FIGURE 1 - Effect of different concentrations of FGF10 on AngII-induced meiotic resumption of oocytes co-cultured with follicular hemisections for 7h 56

FIGURE 2 - Meiosis resumption of bovine oocytes cultured for 7h with or without follicular hemisections treated with fibroblast growth factor 10 and/or angiotensin II 57

FIGURE 3 - Meiotic resumption after co-culture of bovine oocytes and follicular hemisections treated with progesterone (P4), P4 + fibroblast growth factor 10 (FGF10) or P4+ indomethacin (indo) for 7h..... 58

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABLE 1 – Maturation media osmolality (mOsm kg ⁻¹) in different culture systems during 24 hours of incubation at 39°C in a saturated humidity atmosphere containing 5% CO ₂ and 95% air.....	38
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Sistemas de cultivo de oócitos e embriões.....	13
2.2 Maturação nuclear do oócito bovino	15
2.2.1 Angiotensina II	18
2.2.2 Fator de crescimento fibroblástico 10	19
2.2.3 Progesterona	22
3 CAPÍTULO 1.....	25
4 CAPÍTULO 2	42
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÃO.....	62
7 REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

O reinício da meiose de oócitos bovinos é um complexo evento ainda não completamente elucidado. Sabe-se que as células foliculares são responsáveis por manter o oócito em vesícula germinativa (VG; SIRARD & BILODEAU, 1990; RICHARD & SIRARD, 1996) até que ocorra o pico ovulatório de LH. Esta gonadotrofina atua nas células foliculares promovendo uma série de transformações no ambiente folicular que culminam com a expansão do cumulus, maturação do oócito e ovulação. O completo entendimento dos diversos eventos que regulam a maturação nuclear de oócitos ainda não está alcançado e é um passo importante para aplicação de técnicas de reprodução assistida envolvendo oócitos.

Oócitos bovinos não expressam receptores de LH (NUTTINCK et al., 2004), o que indica que a ação desta gonadotrofina é mediada por fatores produzidos pelas células foliculares. Alguns fatores promotores do reinício da meiose que medeiam a ação do LH já foram identificados. Resultados obtidos em nosso laboratório demonstram que a angiotensina II (AngII) é capaz de reverter o efeito inibitório das células foliculares sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos (GIOMETTI et al., 2005) atuando através de receptores tipo 2 de AngII (AT2; BENETTI et al., 2008). Além disso, a concentração de AngII aumenta após o pico ovulatório de LH em bovinos e a administração *in vivo* de um bloqueador específico deste peptídeo inibiu o reinício da meiose nesta espécie (BARRETA et al., 2008). A ação da AngII na maturação nuclear dos oócitos só foi observada na presença de células foliculares, reforçando a hipótese de que este fator seja um intermediário das modificações foliculares induzidas por LH. O efeito positivo da AngII na reversão do efeito inibitório das células foliculares é bloqueado pela indometacina, um inibidor não seletivo das ciclooxigenases (BARRETA et al., 2008), sugerindo que a AngII interage com as prostaglandinas para promover a maturação nuclear de oócitos bovinos.

Os esteróides produzidos pelas células foliculares também parecem indispensáveis na retomada da divisão meiótica (WANG et al., 2006). O pico ovulatório de LH está associado ao aumento na secreção de progesterona e expressão de seus receptores; e estes correlacionados com um aumento na expressão de ciclooxigenase 2 (COX2) e secreção de prostaglandinas (BRIDGES et al., 2006). YAMASHITA et al. (2003) demonstraram que a elevação dos níveis de progesterona secretada pelas células do cumulus ou adicionada ao

meio antecipam o reinício da meiose de oócitos suínos. SIROTKIN (1992) demonstrou que a progesterona é capaz de estimular o reinício da meiose e maturação de oócitos bovinos *in vitro* na ausência de inibidores. Além disso, a progesterona é capaz de reverter o efeito inibitório das células foliculares sobre a maturação de oócitos de maneira dose-dependente (BOHRER et al., 2008). Associado a isto, a maturação de complexos cumulus-oócitos (CCOs) de porcas na presença de uma camada de óleo sobre o meio é atrasada pela passagem de esteróides do meio para o óleo (SHIMADA et al., 2002). Portanto, várias evidências apontam para uma participação dos esteróides no processo de maturação nuclear de oócitos, no entanto, os sistemas atuais de cultivo na presença de óleo representam uma barreira para melhor entender a participação destes fatores na maturação oocitária.

Diversos sistemas de cultivo vêm sendo utilizados no estudo da maturação de oócitos. O co-cultivo de oócitos e metades foliculares (RICHARD & SIRARD, 1996) tem sido um bom modelo experimental para estudar a interação entre células foliculares e maturação, possibilitando a comunicação entre oócitos, células do cumulus, células da granulosa e teca. As metades foliculares, quando dissecadas e cultivadas em condições adequadas, em meios suplementados com gonadotrofinas, mantêm a atividade esteroidogênica (KOMAR et al., 2001). REINSBERG et al. (2004) desaconselham a utilização de óleo em cultivos envolvendo células com atividade esteroidogênica. Além de alterar a composição do meio, removendo componentes lipossolúveis secretados pelas células foliculares e do cumulus, a utilização de óleo neste sistema de cultivo dificultaria muito a manipulação. O primeiro objetivo do presente trabalho foi estabelecer um sistema de cultivo que evite a evaporação de água dos meios na ausência de óleo, para ser utilizado na experimentação científica bem como na produção *in vitro* de embriões.

Após o estabelecimento do sistema de cultivo livre de óleo, iniciou-se o estudo da regulação do reinício da meiose de oócitos bovinos. Sabe-se que o fator de crescimento fibroblástico 10 (FGF10) é expresso pelas células da teca e pelo oócito bovino (BURATINI et al., 2007), sendo seu receptor FGFR2b expresso pelas células da granulosa mural e do cumulus (CHO et al., 2008). Além disso, o FGF10 inibe a expressão de receptores AT2 quando adicionado em cultivo de células da granulosa (PORTELA et al., 2008) e a ativação dos receptores FGFR2b pelo FGF7 inibe a produção de progesterona estimulada por hCG em células da granulosa luteinizadas (PARROTT & SKINNER, 1998). A ativação dos receptores dos FGFs está envolvida na manutenção do oócito em vesícula germinativa (VG) em camundongos (PELUSO et al., 2006). Entretanto, apesar das evidências da participação do FGF10 na comunicação entre as células foliculares e o oócito, o papel deste fator no reinício

da meiose de oócitos bovinos ainda não foi estudado. A partir dos resultados em folículos e oócitos, formulou-se a hipótese de que o FGF10 seja um fator inibidor do reinício da meiose de oócitos bovinos induzido pela AngII. A interação entre a progesterona e o FGF10 também foi testada. Portanto, o objetivo do segundo trabalho foi identificar o papel do FGF10 no reinício da meiose estudando sua interação com fatores envolvidos na retomada da divisão meiótica do oócito.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sistemas de cultivo de oócitos e embriões

A busca por sistemas de cultivo *in vitro* de oócitos e embriões que mimetizem as condições fisiológicas ainda é um desafio. Meios de cultivo que possuam todos os constituintes necessários para a maturação, fecundação e cultivo embrionário ainda vêm sendo buscados (FEUGANG et al., 2008). A influência de diferentes condições de cultivo também continua sendo testada (ROH et al., 2008). Estudos iniciais de cultivo embrionário foram realizados em garrafas ou placas de vidro estéreis ou de plástico descartável com diferentes formatos e volumes, as quais eram preenchidas com grandes volumes de meio de cultivo, geralmente coberto com óleo (BRINSTER, 1968). Entretanto, com o passar do tempo observou-se que o desenvolvimento embrionário é facilitado quando grupos de embriões são cultivados em proximidade, provavelmente devido à maior concentração de fatores de crescimento secretados pelas células embrionárias no meio. A partir deste conceito, foram desenvolvidos sistemas visando o cultivo de embriões em volume reduzido de meio como o sistema *well of the well* e o *glass oviduct* (VAJTA et al., 2000; THOUAS et al., 2003).

O controle da osmolalidade durante a produção *in vitro* de embriões é imprescindível para a obtenção de taxas de blastocisto aceitáveis (KRUGER et al., 1985). A evaporação dos meios de cultivo e conseqüente aumento da osmolalidade e da concentração de sais leva a inúmeras alterações e as células que não se adaptam entram em apoptose (BURG et al., 2007). O aumento na concentração de cloreto de sódio (NaCl) no meio de fecundação está associado a uma maior taxa de polispermia, causando um bloqueio do desenvolvimento embrionário (ROH et al., 2002). Recentemente, relatou-se que a exposição de oócitos suínos a um meio hiperosmótico durante as primeiras 48 horas após a fecundação leva a um aumento nas taxas de blastocisto (HWANG et al., 2008). Porém, os mesmos autores concordam que o restante do período de cultivo deve ser conduzido sob osmolalidade constante (270mOsmol kg⁻¹).

A utilização de uma camada de óleo mineral, óleo de parafina ou óleo de silicone sobre os meios de cultivo tornou-se uma prática corriqueira em muitos laboratórios para se evitar a evaporação da água. Porém, já foram identificados efeitos negativos da presença de óleo no sistema de cultivo. Constituintes lipofílicos como esteróides e ácidos graxos produzidos pelas células ou adicionados aos meios de cultivo são atraídos para a camada de óleo (SHIMADA et al., 2002; REINSBERG et al., 2004). Substâncias tóxicas presentes nos

óleos sintéticos, como metais pesados, podem passar para os meios de cultivo (ERBACH et al., 1995). No caso de utilização de óleo mineral, a peroxidação resulta em liberação de radicais livres que prejudicam o desenvolvimento embrionário (OTSUKI et al., 2008). A grande variabilidade na composição de diferentes lotes de óleo é outra desvantagem. Há relatos na literatura de partidas de óleo de silicone cuja utilização esteve associada com total perda de viabilidade embrionária durante a criopreservação, devido a alterações da composição lipídica dos meios e conseqüentemente dos constituintes das membranas celulares (VAN SOOM et al., 2001).

A presença de óleo sobre o meio de maturação de complexos cumulus-oócitos (CCOs) suínos resulta em severa diminuição na concentração de esteróides sintetizados pelas células ao término do cultivo. Esta diminuição está associada a um atraso no reinício da meiose, redução das taxas de clivagem e blastocisto (SHIMADA et al., 2002). REINSBERG et al. (2004) desaconselham a utilização de óleo sobre o meio em experimentos que utilizam cultivos de células com atividade esteroidogênica, devido a grande influência da presença de óleo nos níveis de esteróides. Complexos cumulus-oócitos bovinos secretam esteróides, principalmente progesterona, durante a maturação *in vitro* e a suplementação de gonadotrofinas regula a atividade esteroidogênica (MINGOTI et al., 2002; SCHOENFELDER et al., 2003). Os esteróides ativadores de meiose (MAS) como FF-MAS e T-MAS parecem desempenhar importantes funções na promoção do reinício da meiose (BYSKOV et al., 2002). Estes esteróides são caracterizados pela elevada solubilidade em lipídeos e por serem altamente hidrofóbicos.

A participação dos esteróides na maturação de oócitos já foi demonstrada em anfíbios (GOTOH et al., 1991), suínos (SHIMADA & TERADA, 2002), primatas (BORMAN et al., 2004) e bovinos (SIROTKIN, 1992; WANG et al., 2006; BOHRER et al., 2008). Portanto, o estudo de eventos relacionados com a maturação nuclear de oócitos não deve ser realizado em sistemas de cultivo que utilizam qualquer tipo de óleo. Diversos modelos para estudo da maturação nuclear de oócitos *in vitro* são utilizados pela comunidade científica. O modelo de co-cultivo de oócitos e metades foliculares (RICHARD & SIRARD, 1996) é um dos mais completos, uma vez que possibilita a interação entre oócitos, células do cumulus, células da granulosa e teca. Além de alterar a composição do meio, a utilização de óleo neste sistema de cultivo dificultaria muito a manipulação. O cultivo de oócitos e embriões em microtubos permite a manutenção de uma osmolalidade constante e índices aceitáveis de produção embrionária (ROH et al., 2008). No entanto, os microtubos não recebem tratamentos específicos necessários para suportar o cultivo celular. Além disso, a manipulação e

visualização são prejudicadas, aumentando a chance de perda de estruturas. No presente estudo, propomos um sistema livre de óleo em placas de cultivo de quatro poços. De acordo com nossa hipótese, a adição de água entre os poços de cultivo é suficiente para evitar a evaporação dos meios por aumentar a saturação da umidade no interior da placa. Este sistema poderia ser utilizado em experimentos envolvendo maturação, fecundação ou cultivo embrionário sem que houvesse interferência do óleo sobre a composição do meio.

2.2. Maturação nuclear do oócito bovino

A formação dos oócitos é iniciada durante o período embrionário, na fase de gastrulação. Células epiblasticas não comprometidas colonizam a crista germinativa do embrião onde se diferenciam em células germinativas primordiais, posteriormente diferenciando-se em oogônias (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Após o período de proliferação mitótica, as oogônias iniciam a divisão meiótica, passando pelas fases de leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno da prófase I. Durante o estágio diplóteno, também conhecido como estágio de vesícula germinativa (VG), ocorre o primeiro bloqueio da divisão meiótica.

In vivo, o reinício da divisão meiótica ocorre simultaneamente ao pico de LH, em oócitos que completaram o crescimento e apresentam completa competência meiótica, ou após a atresia folicular. A remoção do oócito do ambiente folicular promove o reinício da divisão meiótica *in vitro* (PINCUS & ENZMANN, 1935). Estes fatos evidenciam que no folículo são produzidos fatores que impedem a maturação nuclear e que o pico ovulatório de LH cessa a produção de inibidores e estimula a síntese de fatores promotores da meiose. Após o estímulo para reiniciar a meiose (hora 0) ocorre o rompimento da vesícula germinativa (RVG; 7 a 12h) e o oócito passa pelas fases de metáfase I (MI; entre 12 e 15h), anáfase e telófase I (AI e TI; de 15 a 18h) e metáfase II (MII; de 18 a 24h) na qual ocorre a extrusão do primeiro corpúsculo polar (WU et al., 1997). O oócito passa a ser uma célula haplóide permanecendo bloqueado em MII até que ocorra a fecundação ou ativação.

Oócitos bovinos se tornam competentes para reiniciar a meiose no momento da aquisição do antro folicular, quando cessam o crescimento apresentando cerca de 115µm de diâmetro (OTOI et al., 1997). Isto ocorre porque durante o crescimento o oócito armazena RNAm de fatores indispensáveis para o reinício e progressão da divisão meiótica que passam a ser traduzidos sob estímulo de fatores regulados pelo pico de LH, uma vez que o oócito não

expressa receptores para esta gonadotrofina (NUTTINCK et al., 2004). A competência se dá principalmente pelo acúmulo de RNAm para o fator promotor da maturação (MPF). Oócitos competentes também apresentam altos níveis da enzima p34cdc2, essencial para a progressão da fase G2 do ciclo celular (intervalo entre síntese de DNA e divisão celular) para a fase M (divisão celular, meiose). O acúmulo de RNAm é resultante do encurtamento da cauda poli-A, o que impede a tradução até que ocorra o reinício da maturação nuclear. A poliadenilação e tradução de RNAm necessários para condensação da cromatina e rompimento da vesícula germinativa (RVG) ocorre 6 horas após o início da maturação, enquanto que os RNAm necessários para a formação do fuso e ativação de fatores como a MAPK e MPF começam a ser traduzidos após 9 a 12 horas (KRISCHEK & MEINECKE, 2002).

O MPF apresenta duas subunidades, sendo uma catalítica (p34cdc2) e outra regulatória (cyclina B). Para que ocorra a ativação do MPF, a p34cdc2 deve ser desfosforilada em treonina 14 e tirosina 15 pela enzima fosfatase cdc25 (LINCOLN et al., 2002). WU et al. (1997), medindo a atividade da histona H1, quantificaram os níveis de MPF durante a maturação de oócitos bovinos. Durante o rompimento da vesícula germinativa os níveis de MPF estão baixos. Níveis máximos são observados em MI, ocorrendo uma diminuição durante os estádios de anáfase e telófase e um novo aumento em MII. A queda dos níveis de MPF ocorre imediatamente após a fecundação e ativação ou gradativamente até 30 horas após atingir a fase de MII.

Outro fator promotor da maturação de oócitos bovino é a MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) também conhecida como ERK (*extracellular regulated kinase*). Duas isoformas da ERK foram descritas, sendo a ERK2 mais abundante em oócitos bovino. Sua ativação ocorre durante o rompimento da vesícula germinativa, sendo que seus níveis permanecem elevados até a formação dos pronúcleos (FISSORE et al., 1996). A ativação da MAPK não é necessária para que ocorra o rompimento da vesícula germinativa, porém é essencial na manutenção do oócito em MII, formação dos fusos e regulação do ciclo celular, mantendo a atividade do MPF (GORDO et al., 2001). FAIR et al. (2007), utilizando microarranjos, observaram alta expressão de genes reguladores da atividade da MAPK durante o processo de maturação em oócitos bovinos.

Além do envolvimento dos fatores promotores da maturação, o reinício da meiose também é regulado por fatores inibidores produzidos pelas células foliculares. Este fato pode ser evidenciado pela manutenção de oócitos em VG quando cultivados com metades foliculares ou em meio condicionado pelas mesmas (SIRARD & FIRST, 1988; RICHARD & SIRARD, 1996; GIOMETTI et al., 2005). A adenosina monofosfato cíclica (AMPC) está

relacionada com a inibição do reinício da meiose em diversas espécies. Em bovinos, o AMPc causa um atraso no reinício da meiose mas não impede que os oócitos atinjam MI (SIRARD & FIRST, 1988). Os níveis de AMPc presentes nas células do cumulus e no oócito são dependentes da síntese pela adenilato ciclase e da degradação pelas fosfodiesterases. Em bovinos, a fosfodiesterase tipo 3 (PDE3) é uma das principais enzimas envolvidas na degradação do AMPc, sendo que a sua inibição *in vitro* atrasa o reinício da meiose pela diminuição da degradação e conseqüente aumento de AMPc (BILODEAU-GOESEELS, 2003). O cultivo de CCOs de camundongos na presença de um inibidor da PDE3 (Org9935) bloqueia totalmente o reinício da meiose (ROMERO & SMITZ, 2008).

O pico ovulatório de LH interrompe a comunicação (junções intercomunicantes) entre as células da granulosa (WIESEN & MIDGLEY, 1993). Acredita-se que esta quebra na comunicação bloqueie a passagem de fatores inibidores do reinício da meiose produzidos pelas células foliculares. A manutenção da comunicação entre as células do cumulus e o oócito é mantida até o momento da ruptura da vesícula germinativa. O pico de FSH (logo após o pico de LH) pode ser responsável pela indução da síntese de fatores promotores do reinício da divisão meiótica produzidos nas células do cumulus, os quais atuam sobre o oócito através das junções intercomunicantes (BYSCOV et al., 2002).

A regulação dos eventos responsáveis pela retomada da divisão meiótica e completa maturação do oócito ainda não foi completamente elucidada. O pico de LH parece ser um sinal comum para ativar o MPF e a MAPK no oócito, promovendo a maturação. Porém, a ausência de receptores de LH em oócitos bovinos indica que os sinais que induzem o reinício da meiose são provenientes das células foliculares e do cumulus (BALTAR et al., 2000). Alguns fatores de crescimento já foram identificados como possíveis reguladores da maturação nuclear. Fatores de crescimento associados ao fator de crescimento epidermal (*EGF-like growth factors*), como a anfiregulina, epiregulina e betacelulina foram recentemente apontados como sendo os principais mediadores dos efeitos do LH sobre a expansão do cumulus, maturação de oócitos e ovulação (PARK et al., 2004; ROMERO & SMITZ, 2008). Em bovinos demonstrou-se que os genes *EGR1* (*early growth response 1*), *sprouty-2*, *cytochrome C oxidase*, *matrix metalloproteinase inducer*, *matrix metalloproteinase*, epiregulina, receptores de progesterona e de prostaglandina são positivamente regulados pelo pico de LH (ROBERT et al., 2001). Em camundongos, a manutenção do oócito em vesícula germinativa parece estar associada à ativação de receptores dos fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs; PELUSO et al., 2006). Porém, a participação dos FGFs na regulação da maturação nuclear de oócitos bovinos ainda não foi relatada.

2.2.1. Angiotensina II

A angiotensina II (AngII) é um dos principais fatores envolvidos na manutenção do equilíbrio osmótico e regulação da pressão sanguínea. Sua produção inicia com a clivagem do precursor angiotensinogênio pela renina formando a angiotensina I, a qual é convertida em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina (ECA). Os rins são os principais órgãos de produção de AngII, no entanto, existe um sistema ovariano local de secreção de AngII (para revisão: GONÇALVES et al., 2006; PAUL et al., 2006).

A existência de um sistema renina-angiotensina ovariano foi comprovada em diferentes espécies. HUSAIN et al. (1987) detectaram concentrações ovarianas de AngII 8 a 75 vezes superiores às do plasma, não sendo reduzidas em animais nefrectomizados bilateralmente. A concentração de pró-renina e renina ativa no fluido folicular bovino é regulada por gonadotrofinas, e parece ser regulada pelo pico de LH (HAGEMANN et al., 1994). A expressão do angiotensinogênio, precursor do sistema renina-angiotensina, também foi identificada no ovário (OHKUBO et al., 1986). Já a atividade da ECA no ovário parece ser limitada, estando seus níveis positivamente correlacionados aos níveis de progesterona no fluido folicular (NIELSEN et al., 2002). No entanto, parece que no ovário outras enzimas têm a capacidade de clivar a angiotensina I para formação de AngII. HUSAIN et al. (1987) obtiveram, *in vitro*, AngII a partir do angiotensinogênio, utilizando como enzima catalisadora o ativador do plasminogênio. O pico ovulatório de LH resulta em aumento nos níveis intrafoliculares de AngII (ACOSTA et al., 2000) e maior expressão de receptores do tipo 2 nas células da teca bovina (BRUNSWIG-SPICKENHEIER & MUKHOPADHYAY, 1992).

De acordo com suas características bioquímicas e farmacológicas os receptores de angiotensina (ATs) foram classificados como receptores do tipo 1 a 4 (DINH et al., 2001). Porém, os receptores de angiotensina do tipo 1 (AT1) e 2 (AT2) são os principais mediadores das ações da AngII. O AT1 é responsável pela maioria dos efeitos conhecidos da AngII na homeostase cardiovascular. O receptor AT2 é mediador de efeitos opostos ao AT1 e de funções reprodutivas (BOTTARI et al., 1992; TAKAHASI et al., 1994).

Em bovinos, a AngII está relacionada com o crescimento folicular (FERREIRA et al., 2008), ovulação (FERREIRA et al., 2007), formação do corpo lúteo e luteólise (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004), maturação nuclear (GIOMETTI et al., 2005; BARRETA et al., 2008) e citoplasmática (STEFANELLO et al., 2006) do oócito. A infusão *in vitro* de AngII em ovários bovinos pela técnica de microdiálise aumentou a síntese de progesterona e prostaglandinas pelas células foliculares (ACOSTA et al., 1999). JOHNSON et al. (1997) sugerem que a

AngII é um dos mediadores da esteroidogênese ovariana induzida por gonadotrofinas, estimulando a produção de progesterona através da modulação da atividade e expressão da enzima 3β -HSD. Os mesmos autores demonstraram que esta ação é mediada por receptores AT2. Em células da granulosa humana luteinizadas, na presença de hCG, a AngII estimula a secreção de progesterona e o bloqueio dos seus receptores através de um inibidor não seletivo (saralasin) aumenta a síntese de estradiol, indicando um efeito negativo da AngII na secreção deste esteróide (MORRIS et al., 1994).

ACOSTA et al. (1999) determinaram a expressão de AT1 e AT2 nas células da teca em bovinos, observando aumento na expressão de AT2 após o aumento nas concentrações foliculares de estradiol, enquanto que a expressão relativa de AT1 permaneceu constante. BERISHA et al. (2002) identificaram a expressão de receptores AT2 na teca e granulosa de folículos bovinos, sendo sua expressão constante nas células da granulosa e positivamente correlacionada com os níveis de estradiol nas células da teca.

Sabe-se que a AngII é capaz de reverter o efeito inibitório das células foliculares ou do meio condicionado pelas mesmas sobre a maturação dos oócitos bovinos *in vitro* (GIOMETTI et al., 2005). Utilizando um modelo *in vivo* de injeção intrafolicular também foi demonstrado que a ativação dos receptores de AngII é essencial para que ocorra o reinício da meiose induzido pelo pico ovulatório de LH (BARRETA et al., 2008). Além disso, o bloqueio dos receptores de AngII através de injeção intrafolicular de saralasin inibiu a ovulação quando realizada até 6 horas após a administração de GnRH (FERREIRA et al., 2007), indicando uma participação da AngII no início da cascata ovulatória, mediando as ações do LH. O receptor AT2 foi identificado como sendo o responsável por mediar o efeito positivo da AngII no reinício da meiose e maturação de oócitos bovinos (BENETTI et al., 2008) bem como na ovulação (FERREIRA et al., 2007). Estes resultados evidenciam a participação da AngII como mediador intrafolicular do LH no início da cascata da ovulação e maturação nuclear de oócitos. Após a ativação dos receptores AT2, a AngII utiliza a via das ciclooxigenases para exercer seu efeito positivo na maturação dos oócitos através de um incremento na síntese de prostaglandinas (BARRETA et al., 2008).

2.2.2. Fator de crescimento fibroblástico 10 (FGF10)

Descrito como uma proteína composta por 215 aminoácidos (26kDa) expressa em embriões e no pulmão de ratos adultos, o FGF10 foi o décimo peptídeo da família dos fatores

de crescimento fibroblástico a ser identificado (YAMASAKI et al., 1996). Camundongos *knockout* para o gene deste fator apresentaram ausência completa de pulmões, indicando um papel do FGF10 na organogênese (MIN et al., 1998; SEKINE et al., 1999). Atualmente, há mais de 20 fatores de crescimento pertencentes à família FGF, exercendo suas atividades através de ligação aos receptores tirosina quinase FGFR1-FGFR4 (COUGHLIN et al., 1988). Transcritos alternativos dos receptores FGFR1-FGFR3 foram identificados, aumentando a diversidade e especificidade de ligação dos receptores (ITOH & ORNITZ, 2004). Sabe-se que os FGFs são expressos no ovário, estando envolvidos em diferentes eventos fisiológicos como ativação de folículos primordiais de ratos (NILSSON et al., 2001) e, em bovinos, no crescimento inicial do oócito (FGF7; CHO et al., 2008) e seleção do folículo dominante (FGF2; BERISHA et al., 2000).

IGARASHI et al. (1998), estudando as propriedades biológicas do FGF10, identificaram semelhanças com o fator de crescimento de queratinócitos (KGF ou FGF7) na sequência de aminoácidos, especificidade de ligação ao receptor FGFR2b (KGFR) e nos locais de ação, constatando diferenças nos padrões de expressão. Ambos são expressos por células do estroma e tem como alvo as células epiteliais. A similaridade entre o FGF7 e o FGF10 sugere que estes fatores atuam de forma sinérgica ou redundante e fez com que o FGF10 passasse a ser conhecido como KGF-II.

Quanto à participação no controle da fisiologia reprodutiva, estudos realizados no útero neonatal ovino detectaram a expressão gênica do FGF10 e do FGF7. Ambos parecem participar da regulação da morfogênese endometrial, onde o FGF10 atuaria direcionando o crescimento e ramificação glandular e o FGF7 estimulando a proliferação celular epitelial (CHEN et al., 2000). Estudos recentes demonstram que a expressão do FGF10 no endométrio de ovelhas é estimulada pela progesterona, o que indica um envolvimento deste fator na regulação da função endometrial, favorecendo o crescimento e desenvolvimento embrionário no período próximo da implantação do embrião (SATTERFIELD et al., 2008). Em bovinos, o padrão de expressão do FGF10 pelas células embrionárias é muito semelhante ao do *interferon tau* (IFNT), sendo altamente expresso em embriões no período de implantação (COOKE et al., 2008). Os mesmos autores demonstraram que a adição de FGF10, FGF1 ou FGF2 em cultivo de células trofoblásticas aumenta a expressão de RNAm de IFNT e a concentração desta proteína no meio condicionado. Esses resultados fornecem fortes evidências da participação do FGF10 no reconhecimento materno da gestação em ruminantes.

No ovário, a expressão do RNAm do FGF10 foi detectada nas células da teca e estroma em humanos (TANIGUCHI et al., 2008) e em oócitos, células da teca de folículos

antrais e células luteais em bovinos (BURATINI et al., 2007; CASTILHO et al., 2008a). Apesar da similaridade entre os fatores, estudos indicam alta expressão do RNAm do FGF10 e ausência do FGF7 em oócitos bovinos (BURATINI et al., 2004). Uma vez que as células da granulosa expressam receptores para o FGF10 (BERISHA et al., 2004), os resultados sugerem o envolvimento deste fator na sinalização parácrina oriunda do oócito e células da teca alvejando as células da granulosa. Além disso, os níveis de RNAm do FGF10 nas células da teca diminuem conforme aumentam as concentrações intrafoliculares de estradiol, indicando uma regulação durante a foliculogênese (BURATINI et al., 2007). Isto, combinado à observação de que o FSH estimula a expressão do FGFR2b em células da granulosa (BURATINI et al., 2005), sugere que o FGF10 de origem tecal regula as células da granulosa de folículos antrais. BERISHA et al. (2004) identificaram o receptor FGFR2IIIb nas células da granulosa e teca interna de folículos antrais bovinos, sendo sua expressão nas células da granulosa positivamente correlacionada aos níveis de estradiol no fluido folicular. Entretanto, a expressão do receptor FGFR2IIIb não sofre regulação pelo pico ovulatório de LH (BERISHA et al., 2006).

Estudos *in vitro* demonstram que a adição de FGF10 em cultivo de células da granulosa bovina acarreta em diminuição dose-dependente na produção de estradiol e na expressão de receptores tipo 2 de angiotensina II (AT2; BURATINI et al., 2007; PORTELA et al., 2008). Folículos subordinados expressam mais FGF10 em comparação aos folículos dominantes (CASTILHO et al., 2008b). A partir dos dados existentes, BURATINI et al. (2007) sugerem um modelo no qual o FGF10, na fase antral inicial, atuaria como um estimulante da proliferação e inibidor da diferenciação celular. À medida que ocorre o desenvolvimento folicular, a diminuição progressiva na expressão do gene do FGF10 nas células da teca, possibilitaria a diferenciação celular e o aumento na síntese de estradiol.

As células do cumulus também expressam o receptor FGFR2b e a ativação deste pelo FGF7 promove o crescimento inicial de oócitos bovinos (CHO et al., 2008). O envolvimento dos FGFs na maturação nuclear de oócitos só foi demonstrado, até o presente momento, em camundongos. Nesta espécie, a ativação dos receptores dos FGFs parece estar envolvida na manutenção do oócito em vesícula germinativa (VG; PELUSO et al., 2006). A ativação do FGFR2b pelo FGF7 em cultivo de células da granulosa bovina promove a proliferação celular e inibe a expressão de aromatase e a produção de progesterona estimulada por hCG (PARROTT & SKINNER, 1998). Estes dados aliados ao fato de que o FGF10 inibe a expressão de receptores AT2, cuja ativação é essencial para o reinício da meiose de oócitos bovinos, indicam que o FGF10 atua como um fator inibidor do reinício da meiose.

2.2.3. Progesterona

A progesterona produzida pelas células foliculares é formada a partir da pregnenolona através da ação da enzima 3 β -HSD, ou seja, pela via esteroidogênica delta 4. Durante o crescimento folicular inicial, a 3 β -HSD é expressa somente nas células da teca, passando a ser expressa nas células da granulosa do folículo dominante (BAO et al., 1997). Apesar disso, os níveis de progesterona no fluido durante o crescimento folicular são baixos, aumentando após o pico ovulatório de LH (FORTUNE & HANSEL, 1985). Esse aumento parece ser devido a uma menor habilidade de conversão de progesterona a andrógenos pelas células foliculares, uma vez que a expressão das enzimas esteroidogênicas diminui após o pico de LH (VOSS & FORTUNE, 1993; BAO & GARVERICK, 1998; KOMAR et al., 2001). Duas isoformas de receptores de progesterona foram identificadas nas células do cumulus de suínos e a ativação destes regula a expressão de *connexin-43*, principal constituinte das junções intercomunicantes (SHIMADA et al., 2004).

A maturação do oócito ocorre no interior do folículo, na presença de níveis elevados de esteróides. Por este motivo, a participação dos esteróides na maturação nuclear de oócitos é estudada nas diversas espécies. Estradiol e progesterona são sintetizados pelas células do cumulus durante a maturação de oócitos bovinos (MINGOTI et al., 2002). Em suínos, a suplementação destes no meio de cultivo não parece exercer nenhum efeito, o que indica que as células produzem quantidade suficiente destes hormônios (DODE & GRAVES, 2002). Entretanto, YAMASHITA et al. (2003) demonstraram que a elevação dos níveis de progesterona secretada pelas células do cumulus ou adicionada ao meio antecipa o reinício da meiose de oócitos suínos. Este efeito positivo é mediado pelas células do cumulus, uma vez que não se repetiram em oócitos desnudos. A maturação de CCOs de porcas realizada na presença de uma camada de óleo sobre o meio é atrasada pela passagem dos esteróides, principalmente progesterona, do meio para o óleo o que confirma o envolvimento dos esteróides na maturação nesta espécie (SHIMADA & TERADA, 2002).

Em anfíbios já está bem estabelecido o efeito positivo da progesterona na maturação nuclear de oócitos. O reinício da meiose induzido por progesterona em *Xenopus* é mediado por aumento na atividade de MAPK através de sinalização não genômica do esteróide (GOTOH et al., 1991; BAYAA et al., 2000). Experimentos recentes realizados em ratos e camundongos utilizando inibidores de síntese e bloqueadores de receptores sugerem que a progesterona, o estradiol e a testosterona não exercem efeito sobre a maturação nuclear isoladamente (MOTOLA et al., 2007). Em primatas, a administração de progestágeno induz o

reinício da meiose de oócitos mesmo na ausência de um pico de gonadotrofina (BORMAN et al., 2004). Progestágenos alteram a síntese de colesterol causando aumento nos níveis de esteróides ativadores da meiose (MAS) apontados como possíveis mediadores do reinício da meiose induzido por gonadotrofinas em oócitos (BYSKOV et al., 2002).

WANG et al. (2006) obtiveram uma forte inibição da maturação nuclear de oócitos bovinos através do bloqueio da enzima esteroidogênica responsável pela clivagem da cadeia lateral do colesterol. Esta inibição não foi revertida pela adição de progesterona ou estradiol ao meio de cultivo. Porém, o modelo utilizado pelos autores, cultivo de CCOs, apresenta uma forte limitação devido à ausência de células foliculares. SILVA & KNIGHT (2000), utilizando o mesmo modelo, relataram um efeito negativo da progesterona na maturação do oócito bovino avaliado através da taxa de clivagem e produção de blastocistos. Já SIROTKIN (1992) demonstrou que a progesterona é capaz de estimular o reinício da meiose e maturação de oócitos bovinos *in vitro* na ausência de inibidores.

O pico ovulatório de LH está associado a dois picos de produção de progesterona (P4) e com o aumento na expressão de receptores deste esteróide (PR) e de receptores de prostaglandina (PGR) nas células foliculares bovinas (ROBERT et al., 2001; JO et al., 2002). A expressão de receptores de progesterona em células da granulosa *in vitro* é estimulada por LH e FSH e, nas células da teca, somente por LH (JO et al., 2002). A elevação dos níveis de P4 e PR está fortemente correlacionada a um aumento na expressão de RNAm de ciclooxigenase 2 (COX2) e secreção de prostaglandinas (BRIDGES et al., 2006). Além disso, a indução da produção de prostaglandinas durante a maturação de oócitos bovinos está associada a um aumento na síntese de progesterona (BRIDGES & FORTUNE, 2007; NUTTINCK et al., 2008). Em suínos a progesterona já foi apontada como um mediador dos efeitos do LH na diferenciação das células do cumulus e no estímulo do reinício da meiose (OKAZAKI, et al., 2003). SHIMADA et al. (2006) demonstraram que a prostaglandina E2 e os receptores de progesterona são mediadores dos efeitos dos *EGF-like growth factors*. Estes dados sugerem uma interação entre prostaglandinas e progesterona na expansão das células do cumulus e reinício da meiose induzidos pelo pico ovulatório de LH.

Recentemente, BARRETA et al. (2008) demonstraram que o efeito positivo da AngII na maturação nuclear do oócito bovino é mediado pela via das ciclooxigenases. Além disso, a AngII estimula a produção de progesterona em células da granulosa luteinizadas (KOBAYASHI et al., 2002) e em folículos bovinos pré-ovulatórios submetidos a microdiálise *in vitro* (ACOSTA et al., 1999). O fato da progesterona, assim como a AngII, reverter o efeito inibitório das células foliculares sobre a maturação de oócitos (BOHRER et

al., 2008), nos permite inferir que estes dois fatores medeiam as alterações no ambiente folicular induzidas pelo pico de LH.

3. CAPÍTULO 1

TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

**OIL-FREE CULTURE SYSTEM FOR *IN VITRO* BOVINE
EMBRYO PRODUCTION**

**Bernardo Garziera Gasperin, Marcos Henrique Barreta, Joabel Tonellotto
dos Santos, Rogério Ferreira, Jairo Pereira Neves, João Francisco Coelho
de Oliveira, Paulo Bayard Dias Gonçalves**

CIÊNCIA RURAL, 2009

1 **Oil-free culture system for *in vitro* bovine embryo production**

2 **Sistema de cultivo sem óleo para a produção de embriões bovinos**

3 **Bernardo Garziera Gasperin^I Marcos Henrique Barreta^I Joabel Tonello dos Santos^{II}**

4 **Rogério Ferreira^I Jairo Pereira Neves^{III} João Francisco Coelho de Oliveira^{IV} Paulo**

5 **Bayard Dias Gonçalves^{IV*}**

6 **ABSTRACT**

7 Oil has been used to avoid water evaporation from cell culture and thus maintain salt
8 concentration and osmolality. However, the use of oil has several disadvantages, amongst
9 them the migration of compounds from media to oil and from oil to media. The aim of this
10 study was to evaluate the osmolality of a culture system using four-well plates with water in
11 the central hole as an alternative to *in vitro* bovine embryo production (IVP). During the
12 maturation, osmolality was evaluated in media placed in four-well plates covered or not with
13 oil or in four-well plates with purified water in the central hole of the plate. The presence of
14 water in the central hole of four-well plates maintained the osmolality in the same pattern that
15 oil overlay (293 ± 0 and $294 \pm 1.8 \text{mOsm kg}^{-1}$ at the end of the period for Nunc oil and Nunc
16 water, respectively; $P > 0.05$). In washing medium in 35mm dishes, osmolality increased after
17 1 hour when dish was placed on the heated plate in the absence of oil ($280 \pm 1.93 \text{mOsm kg}^{-1}$
18 with oil vs. $291 \pm 3 \text{mOsm kg}^{-1}$ without oil; $P < 0.05$). The effect of osmolality change in oocyte
19 washing and embryo culture media was tested in relation to cleavage and blastocyst rate. The
20 absence of water between the wells of the plates did not affect cleavage rate. Blastocyst rate
21 was higher when embryos were cultured in presence of water (29.7 and 29.9% blastocysts vs.
22 33% in conventional microdrop system; $P > 0.05$), except in the group that oocytes were
23 washed in medium that remained 2 hours on the heated plate without oil overlay (15.1%;

^IAcadêmico do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Santa Maria, RS, Brasil.

^{II}Acadêmico de graduação em Medicina Veterinária, UFSM.

^{III}Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (UNB), Brasília, DF, Brasil.

^{IV}Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM, Hospital Veterinário, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. e-mail: bayard@biorep.ufsm.br. *Autor para correspondência

24 P<0.05). Groups cultured in absence of water in the central hole had lower blastocyst rates
25 (P<0.05) independently of exposure (15.5%) or not (16.2 and 16.8%) to hyperosmotic
26 washing medium. In conclusion, four-well plates with water in the central hole can be an
27 alternative to replace oil overlay for bovine IVP, maintaining stable osmolality and embryo
28 development rates.

29 **Key words:** osmolality, bovine embryo culture, culture systems

30 **RESUMO**

31 O óleo é utilizado em cultivos celulares para evitar a evaporação da água e manter a
32 concentração de sais e a osmolalidade. Entretanto, o uso do óleo tem algumas desvantagens,
33 incluindo a migração de componentes do meio para o óleo e do óleo para o meio. O objetivo
34 desse estudo foi avaliar a osmolalidade de um sistema de cultivo utilizando placas de quatro
35 poços com água no orifício central como uma alternativa para produção *in vitro* (PIV) de
36 embriões bovinos. Durante a maturação, a osmolalidade foi avaliada em meio acondicionado
37 em placas de quatro poços coberto ou não com óleo ou em placas de quatro poços contendo
38 água purificada no orifício central. A osmolalidade do meio acondicionado em placas na
39 presença de água no orifício central não diferiu em relação ao meio coberto com óleo (293±0
40 e 294±1,8mOsm kg⁻¹ ao término do cultivo para Nunc óleo e Nunc água, respectivamente;
41 P>0,05). No meio de lavagem acondicionado em placas de 35mm, a osmolalidade aumentou
42 após uma hora sobre a placa térmica na ausência de óleo (280±1,93mOsm kg⁻¹ com óleo vs.
43 291±3mOsm kg⁻¹ sem óleo; P<0,05). O efeito da alteração da osmolalidade nos meios de
44 lavagem dos oócitos e de cultivo foi testado em relação às taxas de clivagem e blastocisto. A
45 ausência de água entre os poços das placas de cultivo não afetou a taxa de clivagem. A taxa de
46 blastocisto foi maior nos grupos cultivados na presença de água (29,7 e 29,9% blastocistos vs.
47 33% no sistema convencional; P>0,05), exceto no grupo em que os oócitos foram lavados em
48 meio sem óleo que permaneceu 2h sobre a placa térmica aquecida (15,1%; P<0,05). Os
49 grupos cultivados na ausência de água no orifício central da placa apresentaram menor taxa de

50 blastocisto ($P < 0,05$) independente da exposição (15,5%) ou não (16,2 and 16,8%) ao meio de
51 lavagem hiperosmótico. Portanto, placas de quatro poços com água no orifício central podem
52 ser uma boa alternativa para substituir o óleo em sistemas de PIV de embriões bovinos,
53 mantendo estável a osmolalidade e o desenvolvimento embrionário.

54 **Palavras chave:** osmolalidade, embriões bovinos, sistemas de cultivo

55 INTRODUCTION

56 In embryo production systems, the amount of media used for cell culture is very low
57 (from 50 μ l to 400 μ l), which makes control of water evaporation crucial to avoid increased
58 salt concentration and, consequently, osmolality. In addition, increased medium salt
59 concentration affects oocyte and embryo development independently of osmolality.
60 Fertilization of oocytes in media with high concentration of NaCl increases polyspermy and
61 impairs embryo development (ROH et al., 2002). Osmolality of culture media is one of the
62 key factors affecting the success of *in vitro* production (IVP) of embryos (LIU & FOOTE,
63 1996). There is some evidence that osmolality of culture medium must remain stable during
64 all the IVP process (KRUGER et al., 1985). However, recent data indicates that increased
65 osmolality in the first two days of culture improved *in vitro* development and reduced
66 apoptosis through regulation of Bax-alpha/Bcl-xl gene expression in porcine embryos
67 (HWANG et al., 2008). Osmotic stresses can also damage DNA, affect DNA replication,
68 DNA transcription and mRNA translation, leading to cellular damage (BURG et al., 2007).

69 Water evaporation from cell culture media has been avoided by oil overlay. However,
70 some studies has been indicated that use of oil can has several disadvantages related to
71 migration of positive lipophilic factors into the oil (SHIMADA et al., 2002), toxic factors
72 from oil to media (ERBACH et al., 1995) and oil storage (OTSUKI et al., 2008). Moreover,
73 deleterious factors (such as zinc) from the silicon oil can diffuse into culture media, impairing
74 embryo development (ERBACH et al., 1995). Also, mineral oil peroxidation can release free

75 radicals that are transferred through the zona pelucida (OTSUKI et al., 2008) affecting oocyte
76 maturation and embryo development.

77 The main positive hydrophobic factors lost in oil are steroids. SHIMADA et al. (2002)
78 reported a delay of oocyte maturation and a decrease in cleavage and blastocyst rates after
79 maturation of swine oocytes in medium with an oil overlay. Since there is strong evidence of
80 roles of steroids during *in vitro* embryo production, mainly during oocyte maturation
81 (SHIMADA & TERADA, 2002; WANG et al., 2006), the addition of oil must be avoided in
82 culture systems to prevent changes in media composition.

83 An alternative to use of oil overlay to prevent changes in osmolality during culture
84 could be to produce a humid microenvironment in four-well dishes. The placement of a
85 reasonable amount of water in the central hole of four-well plates could maintain the plate
86 microenvironment humid and thus prevent the increase of medium osmolality. In the present
87 study we have tested the hypothesis that the presence of water in the central hole of four-well
88 plates maintains stable the osmolality during the different steps of the *in vitro* bovine embryo
89 production system. Furthermore, osmolality changes in the washing and culture media was
90 evaluated in relation to cleavage and blastocyst rate.

91 **MATERIALS AND METHODS**

92 *Osmolality assessment and in vitro production of bovine embryos*

93 Osmolality (mOsm kg⁻¹) was assessed in 50µl of medium from the different culture
94 systems during oocyte washing, maturation and embryo culture in different times using a
95 cryoscopic osmometer^a (Osmomat® 030). For *in vitro* production of bovine embryos, cow
96 ovaries were obtained from a local abattoir and transported to the laboratory in saline solution
97 (0.9% NaCl; 30°C) containing 100IU mL⁻¹ penicillin^b and 50µg mL⁻¹ streptomycin sulphate^b.
98 Cumulus oocyte complexes (COCs) were aspirated from 3 to 8mm diameter follicles with a
99 vacuum pump (vacuum rate of 20mL minute⁻¹). The COCs were recovered and selected
100 according to LEIBFRIED & FIRST (1979) under a stereomicroscope. Grade 1 and 2 COCs

101 (n=20-30) were washed in TCM199^c in different systems according to each group and
102 randomly distributed into 400µl of maturation medium and cultured in an incubator at 39°C in
103 a saturated humidity atmosphere containing 5% CO₂ and 95% air, for 24h. The maturation
104 medium used was TCM199^c containing Earle's salts and L-glutamine supplemented with
105 25mM HEPES^b, 0.2mM pyruvic acid^b, 2.2mg mL⁻¹ sodium bicarbonate^b, 5.0µg mL⁻¹ LH^d,
106 0.5µg mL⁻¹ FSH^d, 10% (v/v) bovine calf serum^c, 100IU mL⁻¹ penicillin^b and 50µg mL⁻¹
107 streptomycin sulphate^b. The osmolality of maturation medium used in all experiments varied
108 between 284-287 mOsm kg⁻¹.

109 After *in vitro* maturation, oocytes were fertilized with tested frozen semen from a
110 Jersey bull. Semen was fractionated on discontinuous Percoll^e gradients as previously
111 described (PARRISH et al., 1986). The sperm were diluted to a final concentration of 2x10⁶
112 sperm mL⁻¹ in Fert-TALP medium containing 10µg mL⁻¹ heparin^b (PARRISH et al., 1988). *In*
113 *vitro* fertilization was carried out by co-culture of sperm and oocytes for 18h in four-well
114 plates in the same atmospheric conditions as those used for maturation. After gamete co-
115 incubation period, cumulus cells were removed by 2 min of vortex. Presumptive zygotes were
116 cultured at 39°C in an incubator culture chamber^f with saturated humidity atmosphere
117 containing 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ for 7 days in 400µl synthetic oviduct fluid (SOF)
118 medium in four-well plates^g (Nunc[®] dishes).

119 *Experiment 1: osmolality assessment during washing and maturation periods*

120 This experiment was performed to evaluate the capability of different oocyte and
121 embryo culture systems to maintain a constant osmolality of media during *in vitro* production
122 steps. The osmolality changes of the oocyte washing medium was assessed from 2mL of
123 TCM199 in 35mm dishes with or without 2mL of silicon oil overlay, leaved closed on a
124 heated plate at 39°C, with a relative humidity between 60% and 80% for different time points.
125 The first evaluation was performed immediately after the medium preparation (hour 0) and

126 one dish was used for each evaluation time to eliminate the effect of volume change. The
127 osmolality was measured every 15 minutes for 4 hours.

128 During the maturation period, osmolality assessments were performed at 0, 6, 12, 18
129 and 24h of incubation. The culture systems were: 1) Four-well plates containing 400µl of
130 maturation medium in each well with or without 3mL of purified water in the central hole of
131 the plate; 2) Four-well plates with 400µl of maturation medium in each well with 400µl of
132 silicon oil covering the medium. We have also performed osmolality assessments in the
133 conventional microdrop system used in our laboratory (200µl medium drops covered with
134 silicon oil in 60mm culture dishes). All osmolality assessments were performed in three
135 replicates.

136 *Experiment 2: in vitro production of embryos in different culture systems*

137 The effect of osmolality change in oocyte washing medium and in different embryo
138 culture steps was tested in relation to cleavage and blastocyst rate. After recovering, oocytes
139 were washed immediately after the addition of 2mL of pre-heated TCM199 in 35mm dishes,
140 which was considered time 0, or 2h after the addition of the medium to the dishes on the
141 heated plate at 39°C covered or not with 2mL of silicon oil. The oocytes remained in washing
142 media for 10-15 min. This period of time was needed to select good quality oocytes and to
143 allocate them in different culture groups. After washing, the oocytes were cultured in four-
144 well plates containing 400µl of medium. Maturation, fertilization and embryo culture were
145 performed in four-well plates in the presence or absence of water in the central hole of the
146 plate. A microdrop system (200µl medium drops covered with silicon oil in 60mm culture
147 dishes) was used as a control. This microdrop system is a standard method used by our
148 laboratory for in vitro production of embryos. The experiment was performed in four
149 replicates. Osmolality was assessed before and at the end of the embryo culture period (day 7
150 after fertilization). The cleavage and blastocyst rates (number of blastocysts divided by the
151 total number of oocytes) were evaluated 2 and 7 days after fertilization, respectively.

152 *Statistical analyses*

153 Osmolality assessments of maturation and washing media were performed as repeated
154 measures data and analyzed using the MIXED procedure with a repeated measure statement.
155 Main effects of treatment group, hour and their interaction were determined. Differences
156 between osmolality at a specific time point were compared between groups using estimates.
157 Data from osmolality of SOF media, cleavage and blastocyst rates were submitted to ANOVA
158 using the General Linear Models (GLM) and multi-comparison between groups was
159 evaluated by least square means. Data were tested for normal distribution using Shapiro-Wilk
160 test and normalized when necessary. Percentage data were submitted to arcsine
161 transformation. All analyses were performed using SAS software package (SAS Institute Inc.,
162 Cary, NC). Results are presented as means \pm standard error of the mean. A $P < 0.05$ was
163 considered statistically significant.

164 **RESULTS AND DISCUSSION**

165 In embryo production system, oocytes are harvested and transferred to a washing dish
166 with culture medium. The osmolality in washing dish is generally disregarded because of the
167 large amount of medium (~2 mL). Addressing this question, it has been observed that the
168 osmolality of oocyte washing medium changed a great deal over time after 60 minutes on a
169 39°C heated plate, which was not detected when the medium was overlaid with silicon oil
170 (Figure 1). These results suggest that addition of oil overlay is only necessary if the washing
171 medium remains more than 45 minutes on the heated plate.

172 After washing procedure, oocytes are usually matured in microdrops of medium
173 covered by oil or in four-well plates. The need of an oil overlay or purified water in the
174 central hole of the four-well plate to minimize evaporation and changes in oocyte maturation
175 medium osmolality was investigated. The presence of water in the central hole of four-well
176 plates maintained the osmolality in the same pattern that oil overlay (Table 1), being the final
177 osmolality of the medium similar to that observed in the conventional microdrop culture

178 system (294 mOsm kg⁻¹). However, the osmolality after 12 hours of culture was higher when
179 medium was disposed in dishes without water or oil. These results show that purified water in
180 the central hole of the four-well plates can be used to replace oil overlay to maintain the
181 osmolality of oocyte maturation and embryo development media. This oil-free system can be
182 a great alternative to maintain the osmolality when co-culture systems of oocytes and
183 follicular cells are used to study the physiology of nuclear maturation in oocytes
184 (STEFANELLO et al., 2006; BARRETA et al., 2008). The oil in co-culture systems must be
185 avoided because the follicular cells produce steroids during the culture and the oil can
186 sequester these steroids and impair the results (REINSBERG et al., 2004).

187 To evaluate the effect of changing osmolality on embryo development, high and low
188 water evaporation systems were tested in relation to cleavage and blastocyst rates. Cleavage
189 rates were not affected by different washing or culture systems (Figure 2A). KIM et al. (2002)
190 tested the effect of different osmolalities on bovine pronuclear formation and polyspermic
191 fertilization rate and concluded that oocytes are more sensitive to osmotic stress than
192 spermatozoa. Nevertheless, these authors did not test the effect of osmolality changes on
193 cleavage rates.

194 After the end of the culture period, the osmolality and blastocyst rates were assessed.
195 The osmolality of SOF medium disposed in plates with water in the central hole was lower
196 than that observed when the hole was kept empty for 7 days of culture (Figure 2C). In our
197 system, there was no difference in culturing oocyte under oil (33% blastocyst from a total of
198 60 oocytes) when compared with oocyte cultured in a four-well plate with purified water in
199 the central hole (29.7 and 29.9% blastocyst; P>0.05). However, oil is a limitation in IVP
200 system because lipophilic compound cannot be present in the culture medium. Therefore, oil
201 must be avoided when it is possible, because toxic effect, breakdown and soluble compounds
202 in oil are some factors that may interfere in the cell culture. SHIMADA et al. (2002) reported
203 that the presence of oil in the swine oocyte maturation system resulted in less progesterone

204 concentration in the medium, delayed swine oocyte maturation and reduced cleavage and
205 blastocyst rate. The evaporation increased osmolality and salt concentration, which is harmful
206 to oocyte and embryo viability. Regardless of evidence that high osmolality during early
207 embryonic stages decreases the number of apoptotic cells and improves blastocyst formation,
208 increase in osmolality is highly detrimental for later stages of embryo development
209 (NGUYEN et al., 2003; HWANG et al., 2008). Bovine embryos require a low constant
210 osmolality near 270mOsm kg⁻¹ (reviewed by WRIGHT & BONDIOLI, 1981). LIU & FOOTE
211 (1996) showed a drastic reduction in bovine embryo production when medium osmolality was
212 300mOsm kg⁻¹. Also, high levels of NaCl impair fertilization, increase polyspermy, decrease
213 blastocyst formation and decrease number of blastomeres (LIU & FOOTE, 1996; ROH et al.,
214 2002). Therefore, the evaporation probably affected oocyte viability due to both increase in
215 salt concentration and osmolality.

216 Interestingly, blastocyst rate decreased significantly when oocytes were washed in
217 medium without oil overlay maintained on the heated plate for 2h, independently of culture
218 system (Figure 2B). In experiment 1, it has been demonstrated that the osmolality increased to
219 near 310mOsm kg⁻¹ when the washing medium remained for 2h on the heated plate without
220 oil. The short-term oocytes exposure to a hyperosmotic medium before maturation did not
221 affect the cleavage rate, but the blastocyst rate was impaired. These results indicate that
222 oocyte viability can be affected by hyperosmotic media in a short-term exposure. Bovine
223 oocyte seems to be very susceptible to injury by osmotic stress, which may end to cytoplasm
224 and molecular impair, resulting in cellular death by apoptosis (BURG et al., 2007).

225 Also, the blastocyst rates were affected when the plate was without water during
226 embryonic culture, independent of the washing medium treatment. The blastocyst rate was
227 higher in groups cultured in presence of water in the central hole of the four-well plate (Figure
228 2B). The percentage of blastocyst (~30%) obtained when osmolality was controlled (control

229 and treatment with water and oil) evidenced that the oocyte maturation and embryo culture
230 system were suitable (STEFANELLO et al., 2006; ROH et al., 2002; RIZOS et al., 2002).

231 CONCLUSIONS

232 The maintenance of osmotic equilibrium and the embryo development rate confirm
233 that four-well plate with water in the central hole can be a feasible alternative to replace oil
234 for bovine embryo culture. The oil overlay is essential if the oocytes remain in the washing
235 medium more than 45 minutes on the heated plate to obtain an acceptable embryo
236 development rate.

237 ACKNOWLEDGEMENTS

238 We are grateful to CNPq and CAPES for the financial support. We also thank Silva
239 abattoir that kindly provided the bovine ovaries.

240 SOURCES OF MANUFACTURES

241 ^aGonotec, Berlin, Germany

242 ^bSigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA

243 ^cGibco Labs, Grand Island, NY, USA

244 ^dBioniche, Belleville, ON, Canada

245 ^eAmersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden

246 ^fCBS Scientific, Del Mar, CA, USA

247 ^gNunc, Roskilde, Denmark

248 REFERENCES

249 BARRETA, M. et al. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear
250 maturation is mediated by prostaglandins E2 and F2 α . **Reproduction**, v.136, p. 733-740,
251 2008.

252 BURG, M.B. et al. Cellular response to hyperosmotic stresses. **Physiol Rev.**, v.87, n.4,
253 p.1441-1474, 2007.

- 254 ERBACH, G.T. et al. Zinc is a possible toxic contaminant of silicone oil in microdrop
255 cultures of preimplantation mouse embryos. **Hum Reprod.**, v.10, n.12, p.3248-3254, 1995.
- 256 HWANG, I. et al. Osmolarity at early culture stage affects development and expression of
257 apoptosis related genes (Bax-a and Bcl-xl) in pre-implantation porcine NT embryos. **Mol**
258 **Reprod Devel.**, v.75, n.3, p.464-471, 2008.
- 259 KIM, B. et al. Effect of medium milieu on sperm penetration and pronuclear formation of
260 bovine oocytes matured *in vitro*. **Theriogenology**, v.57, n.8, p.2093-2104, 2002.
- 261 KRUGER, T.F. et al. Osmolarity studies with different containers and volumes in a human *in*
262 *vitro* fertilization programme. **S Afr Med J.**, v.68, n.9, p.651-652, 1985.
- 263 LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability
264 to mature *in vitro*. **J Anim Sci.**, v.48, n.1, p.76-86, 1979.
- 265 LIU, Z.; FOOTE, R.H. Sodium chloride, osmolyte, and osmolarity effects on blastocyst
266 formation in bovine embryos produced by *in vitro* fertilization (IVF) and cultured in simple
267 serum-free media. **J Assist Reprod Genet.**, v.13, n.7, p.562-568, 1996.
- 268 NGUYEN, V.T. et al. Stage-specific effects of the osmolarity of a culture medium on the
269 development of parthenogenetic diploids in the pig. **Theriogenology**, v.59, n.3-4, p.719-734,
270 2003.
- 271 OTSUKI, J. et al. Damage of embryo development caused by peroxidized mineral oil and its
272 association with albumin in culture. **Fertil Steril.**, 2008 (in press).
- 273 PARRISH, J.J. et al. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**,
274 v.25, n.4, p.591-600, 1986.
- 275 PARRISH, J.J. et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biol Reprod.**, v.38, n.5,
276 p.1171-1180, 1988.
- 277 REINSBERG, J. et al. Pitfalls in assessment of progesterone production by granulosa cells
278 cultured in contact with silicone rubber or paraffin oil. **Arch Gynecol Obstet**, v.270, n.3,
279 p.174-178, 2004.

- 280 RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo
281 development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality.
282 **Mol Reprod Dev.**, v.61, n.2, p.234–248, 2002.
- 283 ROH, S. et al. Improved monospermic fertilization and subsequent blastocyst formation of
284 bovine oocytes fertilized *in vitro* in a medium containing NaCl of decreased concentration. **J**
285 **Vet Med Sci.**, v.64, n.8, p.667-671, 2002.
- 286 SHIMADA, M. et al. Delay of nuclear maturation and reduction in developmental
287 competence of pig oocytes after mineral oil overlay of *in vitro* maturation media.
288 **Reproduction**, v.124, n.4, p.557-564, 2002.
- 289 SHIMADA, M.; TERADA, T. FSH and LH induce progesterone production and progesterone
290 receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes.
291 **Mol Hum Reprod.**, v.8, n.7, p.612-618, 2002.
- 292 STEFANELLO, J.R. et al. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth
293 factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. **Theriogenology**,
294 v.66, n.9, p.2068–2076, 2006.
- 295 WANG, H. et al. Studies of the role of steroid hormone in the regulation of oocyte maturation
296 in cattle. **Reprod Biol Endocrinol.**, v.4, p.4-13, 2006.
- 297 WRIGHT, R.W.; BONDIOLI K.R. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in
298 domestic animals. **J Anim Sci.**, v.53, n.3, p.702-729, 1981.
- 299

300 Table 1- Maturation media osmolality (mOsm kg⁻¹) in different culture systems during 24
 301 hours of incubation at 39°C in a saturated humidity atmosphere containing 5% CO₂ and 95%
 302 air. Data presented as mean ± standard error of the mean. Different letters in the same column
 303 indicate statistical difference between groups (P<0.05).

Hour	0	6	12	18	24
Nunc	287±0.7 ^a	291±0 ^a	294±0.9 ^a	297±1.2 ^a	305±2.4 ^a
Nunc oil	285±1.9 ^a	290±0.9 ^{ab}	291±1.5 ^b	291±1.5 ^b	293±0 ^b
Nunc water	284±0.7 ^a	287±1.2 ^b	290±0.7 ^b	292±1 ^b	294±1.8 ^b

304

305

306

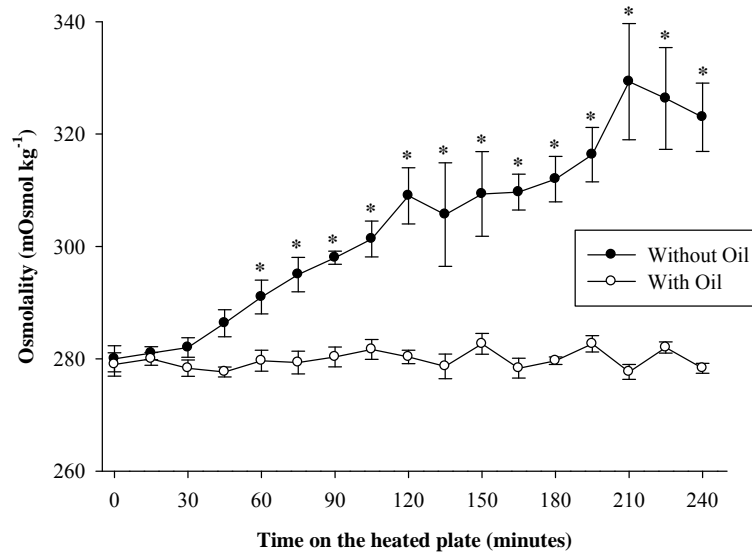
307 **FIGURE LEGENDS**

308 **Figure 1:** Washing media osmolality in 35mm dishes on a heated plate (39°C) with or without
309 oil overlay. The measurements were performed each 15 minutes during 4 hours. The
310 experiment was carried out in three replicates. Data presented as mean \pm standard error of the
311 mean. Asterisk (*) represents difference between groups at specific time points ($P < 0.05$).

312 **Figure 2:** Effect of controlling water evaporation on cleavage rate (Panel A), blastocyst rate
313 (Panel B) and osmolality of synthetic oviduct fluid medium (Panel C). Oocytes were washed
314 in medium that remained 0 or 2h on a heated plate with or without oil overlay. The
315 presumptive embryos were cultured in 400 μ l of medium in four-well plates with or without
316 water in its central hole. The total number of oocytes cultured in each treatment is shown at
317 the base of cleavage bars (Panel A). The SOF medium osmolality was measured at the end of
318 the culture system (7 days after fertilization; Panel C). Data presented as mean \pm standard
319 error of the mean. Different letters indicate statistical difference between groups ($P < 0.05$).

320

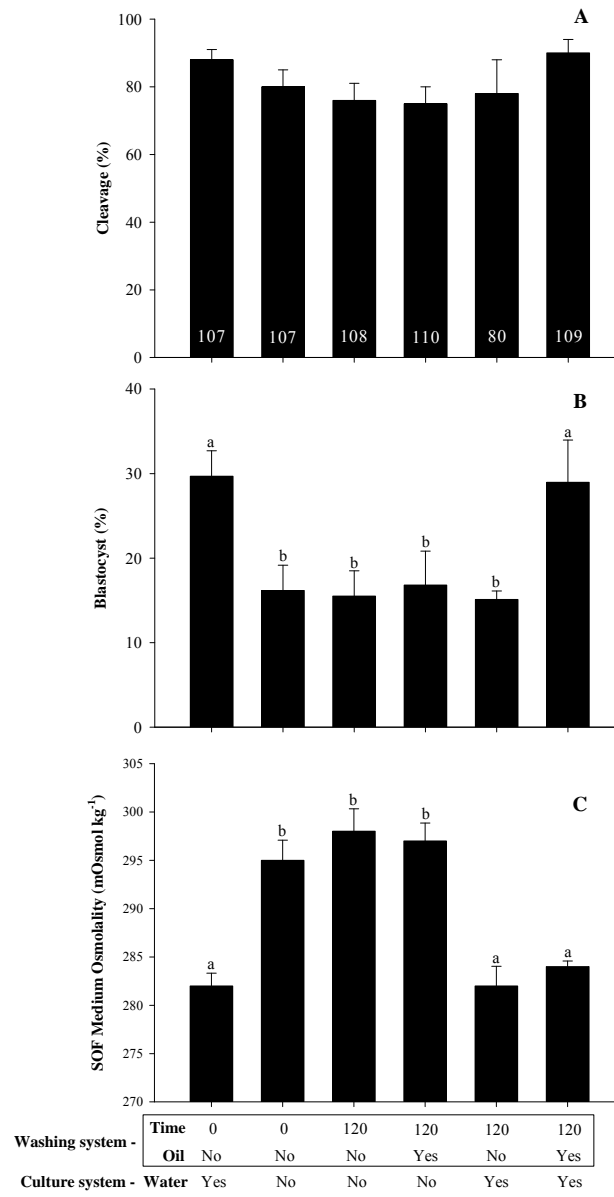
321 Figure 1



322

323

324 Figure 2



325

4. CAPÍTULO 2

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

**FIBROBLAST GROWTH FACTOR 10 INHIBITS
ANGIOTENSIN II BUT NOT PROGESTERONE-INDUCED
BOVINE OOCYTE MEIOTIC RESUMPTION**

**Bernardo Garziera Gasperin, Joabel Tonello dos Santos, Marcos
Henrique Barreta, Rogério Ferreira, João Francisco Coelho de Oliveira,
José Buratini Junior, Paulo Bayard Dias Gonçalves**

CIÊNCIA RURAL, 2009

1 **Fibroblast growth factor 10 inhibits angiotensin II but not progesterone-induced bovine**
2 **oocyte meiotic resumption**

3 **Modulação do reinício da meiose de oócitos bovinos pelo fator de crescimento**
4 **fibroblástico 10, angiotensina II e progesterona**

5 **Bernardo Garziera Gasperin^I Joabel Tonellotto dos Santos^{II} Marcos Henrique Barreta^I**
6 **Rogério Ferreira^I João Francisco Coelho de Oliveira^{IV} José Buratini Junior^{III} Paulo**
7 **Bayard Dias Gonçalves^{IV*}**

8 **ABSTRACT**

9 Oocyte meiotic resumption is a complex event regulated by inhibitory and stimulatory
10 factors. The aim of this study was to test the hypothesis that FGF10 is an inhibitor of AngII-
11 induced meiotic resumption in a co-culture of oocytes and follicular cells. The action of
12 FGF10 on progesterone-induced meiotic resumption was also tested. Aiming to find the
13 optimal dose of FGF10, cumulus-oocyte complexes (COCs) were co-cultured with follicular
14 cells in medium containing AngII (10^{-11} M) with FGF10 at 0, 10, 100 or 1000ng mL⁻¹. All
15 concentrations of FGF10 inhibited the resumption of meiosis induced by AngII. In a second
16 experiment, FGF10 (100ng mL⁻¹) significantly decreased GVBD rate of COCs co-cultured
17 with follicular cells in the presence of AngII (10^{-11} M), having no effect on COCs cultured in
18 the absence or presence of follicular cells without AngII. In a third experiment, FGF10 had no
19 effect on P4 (100ng mL⁻¹)-induced meiotic resumption. Finally, progesterone effect on oocyte
20 meiotic resumption was blocked by indomethacin (10 μ M), suggesting that the action of
21 progesterone is mediated by cyclooxygenases pathway. In conclusion, the results demonstrate
22 that FGF10 is an inhibitor of AngII but not progesterone-induced meiotic resumption and that

^IPrograma de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Santa Maria, RS, Brasil.

^{II}Acadêmico de graduação em Medicina Veterinária, UFSM.

^{III}Departamento de Fisiologia, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

^{IV}Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM, Hospital Veterinário, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. e-mail: bayard@biorep.ufsm.br. *Autor para correspondência

23 FGF10 effect is mediated through follicular cells.

24 **Key words:** angiotensin II, FGF10, progesterone, resumption of meiosis, bovine oocyte

25 **RESUMO**

26 O reinício da meiose é um complexo evento regulado por fatores inibitórios e
27 estimulatórios. O objetivo do presente estudo foi testar a hipótese que o FGF10 atua como
28 inibidor do reinício da meiose induzido pela AngII em co-cultivo de oócitos e células
29 foliculares. A ação do FGF10 no reinício da meiose induzido por progesterona também foi
30 testada. Para identificar a dose ideal de FGF10, complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram
31 co-cultivados com células foliculares em meio contendo AngII (10^{-11} M) e FGF10 nas
32 concentrações de 0, 10, 100 ou 1000ng mL^{-1} . Todas as concentrações de FGF10 foram
33 eficientes na inibição do reinício da meiose induzido pela AngII. Em um segundo
34 experimento, o FGF10 (100ng mL^{-1}) diminuiu significativamente a taxa de rompimento de
35 vesícula germinativa (RVG) de CCOs co-cultivados com células foliculares na presença de
36 AngII (10^{-11} M), não tendo efeito sobre CCOs cultivados na ausência ou presença de células
37 foliculares sem AngII. No terceiro experimento, O FGF10 não afetou o reinício da meiose
38 induzido pela progesterona (100ng mL^{-1}). Finalmente, o efeito da progesterona sobre o
39 reinício da meiose foi bloqueado pela indometacina ($10\mu\text{M}$), o que sugere que a ação da P4 é
40 mediada pela via das ciclooxigenases. Os resultados demonstram que o FGF10 inibe o
41 reinício da meiose induzido pela angiotensina II, mas não pela progesterona e que o efeito do
42 FGF10 é mediado pelas células foliculares.

43 **Palavras-chave:** angiotensina II, FGF10, progesterona, reinício da meiose, oócitos bovinos

44 **INTRODUCTION**

45 Bovine oocytes remain arrested at the prophase of the first meiotic division, also
46 known as germinal vesicle (GV), during follicle development and resume meiosis when the
47 ovulatory luteinizing hormone (LH) surge occurs (AYALON et al., 1972). Meiotic
48 resumption also occurs when oocytes are removed from follicular environment (PINCUS &

49 ENZMANN, 1935), which suggests that follicular cells produce factors that inhibit meiotic
50 resumption. Oocytes cultured in the presence of follicular cells remain arrested in GV or
51 delay meiotic resumption (SIRARD & FIRST, 1988), depending on the culture period. This
52 co-culture system has proven to be a good model to study the role of factors that act through
53 follicular cells on oocyte nuclear maturation. Using this co-culture system, GIOMETTI et al.
54 (2005) showed that angiotensin II (AngII) reverses the inhibitory effect of follicular cells on
55 bovine oocyte nuclear maturation. Moreover, we showed that AngII is essential for LH-
56 induced bovine oocyte nuclear maturation *in vivo* (BARRETA et al., 2008).

57 Progesterone mediates oocyte nuclear maturation in fish and amphibians (GOTOH et
58 al., 1991). In bovines, the gonadotropin surge is associated with two increases in progesterone
59 and progesterone receptor (PR), which are associated with an increase of cyclooxygenases 2
60 mRNA expression and consequently prostaglandins production (BRIDGES et al., 2006).
61 Angiotensin II action on meiotic resumption is mediated by prostaglandins (BARRETA et al.,
62 2008) and AngII is also known by its stimulatory effect on steroidogenesis in follicle
63 development and luteinized granulosa cells (ACOSTA et al., 1999; MORRIS et al., 1994).
64 SIROTKIN (1992) reported a stimulatory effect of progesterone on oocyte meiotic
65 resumption in COCs. Recently, we showed that progesterone reverses the negative effect of
66 follicular cells on bovine oocyte nuclear maturation in a dose-dependent manner (BOHRER et
67 al., 2008).

68 The family of fibroblast growth factors (FGFs) is composed of more than 20 factors,
69 largely studied on embryogenesis, oncogenesis and lately on different moments of
70 reproductive physiology. FGFs are expressed in ovary being involved in primordial follicle
71 activation (NILSSON et al., 2001) and, in bovine, in early oocyte growth (FGF7; CHO et al.,
72 2008) and dominant follicle selection (FGF2; BERISHA et al., 2000). Nevertheless, the
73 knowledge of the role of FGFs on oocyte nuclear maturation is insufficient regarding the
74 evidences of its functions on follicular environment.

75 BURATINI et al. (2007) showed that FGF10 is expressed by bovine theca cells and
76 oocyte. The expression of FGF10 receptor (FGFR2IIIb) was identified in bovine corpus
77 luteum (CASTILHOS et al., 2008), internal theca cells (BERISHA et al., 2004), mural
78 granulosa cells (BURATINI et al., 2007) and cumulus cells (CHO et al., 2008). When added
79 to granulosa cells culture, FGF10 decreased estradiol secretion (BURATINI et al., 2007),
80 which is essential for follicular cells health and follicle growth. Also, FGF10 expression is
81 negatively correlated with estradiol levels on follicular fluid (BURATINI et al., 2007) and the
82 intrafollicular injection of FGF10 inhibits dominant follicle growth (GASPERIN et al., 2008).

83 BENETTI et al. (2008) identified that the positive effect of AngII on bovine oocyte
84 nuclear maturation is mediated through AT2 receptors. The expression of this receptor is
85 positively correlated to follicular fluid levels of estradiol. When added to granulosa cell
86 culture, FGF10 decreases AT2 receptor expression (PORTELA et al., 2008). Also, the
87 activation of FGFR2IIIb by FGF7 inhibits human chorionic gonadotropin (hCG)-induced
88 progesterone secretion by bovine granulosa cells (PARROTT & SKINNER, 1998). Based on
89 these results, our hypothesis is that FGF10 acts on follicular cells inhibiting meiotic
90 resumption of bovine oocytes. The role of FGF10 in bovine oocyte nuclear maturation is
91 unknown. In mice, the activation of FGFs receptors (FGFRs) appears to be involved in the
92 inhibition of germinal vesicle breakdown (GVBD; PELUSO, 2006). The aim of the present
93 study was to assess the role of FGF10 on bovine oocyte meiotic resumption induced by AngII
94 or progesterone in a co-culture of COCs and follicular cells.

95 MATERIAL AND METHODS

96 Bovine ovaries were obtained at a local abattoir and transported to the laboratory in
97 saline solution (NaCl 0,9%; 30°C) with penicillin^a (100IU mL⁻¹) and streptomycin^a (50µg mL⁻¹)
98 ¹). Follicles from 3 to 8mm diameters were aspirated. The oocytes were classified according
99 to LEIBFRIED & FIRST (1979). Grade 1 and 2 COCs were selected under a
100 stereomicroscope and randomly distributed in 200µL drops of maturation medium.

101 Maturation was performed in four well dishes^b with water in the central hole in an incubator
102 at 39°C in a saturated humidity atmosphere containing 5% CO₂ and 95% air. Maturation
103 medium was TCM 199^c with Earle's salts and L-glutamine with 25mM HEPES^a, 0.2mM
104 pyruvic acid^a, 2.2mg mL⁻¹ sodium bicarbonate^a, 5.0µg mL⁻¹ LH^d, 0.5µg mL⁻¹ FSH^d, 0.4% fatty
105 acid-free bovine serum albumin^a (BSA), 100IU mL⁻¹ penicillin and 50µg mL⁻¹ streptomycin
106 sulphate. Eight follicular halves were added to each well with 200µl of maturation medium
107 and 20-30 COCs were cultured in each group.

108 Follicular hemisections were obtained through dissection of 2 to 5mm follicles free of
109 stromal tissue. Follicles were sectioned with a scalpel into equal halves and then the
110 hemisections were washed 10 times in TCM199 (GIOMETTI et al., 2005). At the end of the
111 culture period (7 hours), oocytes were denuded by vortexing and fixed in acetic
112 acid^e:methanol^e (1:3) during 4h and stained with 1% lacmoid^a (in 45% acetic acid in PBS).
113 Nuclear maturation stage was evaluated under an optic microscope (400x) and classified as
114 germinal vesicle (GV) or germinal vesicle breakdown (GVBD; condensed genetic material).

115 *Experiment 1: Dose-response of FGF10 on AngII-induced meiotic resumption*

116 A dose response of FGF10 on meiotic resumption was evaluated. COCs (n= 320) were
117 co-cultured with follicular hemisections for 7 hours in medium containing AngII^a (10⁻¹¹M)
118 with rhFGF10^f (recombinant human FGF10) at 0, 10, 100 or 1,000ng mL⁻¹.

119 *Experiment 2: FGF10 on AngII-induced meiotic resumption*

120 Control COCs were cultured in maturation medium in the absence (positive control;
121 n=84) or presence (negative control; n=88) of follicular hemisections for 7 hours. Four
122 treatment groups were established. COCs were cultured in presence of either: a) AngII with
123 follicular hemisections (AngII group; n=83); b) AngII and FGF10 with follicular
124 hemisections (AngII+FGF10 group; n=82); c) FGF10 with follicular hemisections
125 (FGF10+cells group; n=80) and d) FGF10 without follicular hemisections (FGF10 group;
126 n=88). It was used 10⁻¹¹M of AngII and 100ng mL⁻¹ of FGF10 in each treatment.

127 *Experiment 3: Effect of FGF10 or indomethacin on progesterone-induced meiotic resumption*

128 Control COCs were cultured in maturation medium in the absence (positive control;
129 n=85) or presence (negative control; n=82) of follicular hemisections. Three treatment groups
130 were established. COCs were co-cultured with follicular cells in presence of either: a)
131 progesterone^a (P4 group; n=84); b) P4 plus FGF10 (P4+FGF10 group; n=80) and c) P4 plus
132 indomethacin^a (a COX nonselective inhibitor; P4+indo group; n=85). The doses used were
133 100ng mL⁻¹ for P4 and FGF10 and 10μM indomethacin.

134 *Statistical analyses*

135 Percentages were submitted to arcsine transformation and data were expressed as
136 mean ± standard error of the mean from at least three replicates. Data were tested for normal
137 distribution using Shapiro-Wilk test and submitted to ANOVA. Once a model effect was
138 observed, Tukey multicomparison test was performed. All analyses were performed by
139 General Linear Models (GLM) using SAS software package.

140 **RESULTS**

141 *Dose-response of FGF10 on AngII-induced meiotic resumption*

142 All tested concentrations of FGF10 inhibited the resumption of meiosis induced by
143 AngII (Figure 1; P≤0.05). The highest germinal vesicle breakdown (GVBD) rate was
144 observed when FGF10 was absent (45.3%). At concentrations of 10, 100, and 1000ng mL⁻¹
145 FGF10, the rates of GVBD were 30.2, 29.6 and 27%, respectively.

146 *Interaction between AngII and FGF10 on bovine oocyte meiotic resumption*

147 The experiment was designed to evaluate if FGF10 acts direct on COCs or through
148 follicular cells to inhibit AngII-induced meiotic resumption. The percentage of GVBD
149 decreased when FGF10 was present in the maturation medium containing AngII and follicular
150 cells (37.8%; P≤0.05; Figure 2), compared to oocytes cultured in the same condition without
151 FGF10 (62.6%). The inhibition of meiotic resumption in oocytes cultured in medium with
152 FGF10 and follicular cells (31.3%) did not differ from negative control oocytes (28.5%). In

153 the absence of follicular cells FGF10 did not affect the rate of meiotic resumption (72.9%) in
154 comparison to positive control (80.9%).

155 *Effect of FGF10 or indomethacin on progesterone-induced meiotic resumption*

156 FGF10 did not affect the meiotic resumption induced by P4 (41.1%; $P \geq 0.05$),
157 comparing to oocytes co-cultured in medium with P4 alone (41.7%). However, indomethacin
158 inhibited the induction of meiotic resumption by progesterone (20.1%; Figure 3; $P \leq 0.05$).

159 **DISCUSSION**

160 To our knowledge, this is the first evidence to indicate that FGF10 is an inhibitor of
161 meiotic resumption in mammals. Also we have demonstrated that positive effect of
162 progesterone is inhibited by indomethacin. These results suggest that AngII and progesterone
163 can act at the same pathway to induce oocyte nuclear maturation. Once FGF10 blocked
164 AngII- but not progesterone-induced oocyte meiotic resumption, we can suppose that FGF10
165 and AngII effects are upstream to progesterone receptor signaling. Using a microdialysis
166 system, ACOSTA et al. (1999) demonstrated that AngII induces prostaglandin and
167 progesterone synthesis in the bovine dominant follicle. Recently, BARRETA et al. (2008)
168 showed that AngII acts through cyclooxygenases pathway to promote *in vitro* oocyte meiotic
169 resumption. The activation of progesterone receptors is essential to induce cyclooxygenase 2
170 expression and prostaglandins secretion during the process of ovulation (BRIDGES et al.,
171 2006). Further studies are being carried out to test if progesterone acts as a mediator of AngII
172 action or through a parallel pathway to promote oocyte nuclear maturation.

173 FGF10 may be acting on AngII-induced meiotic resumption by modulating the steroid
174 production in follicular cells. The addition of FGF10 to bovine granulosa cells culture
175 promotes a reduction in estradiol secretion (BURATINI et al., 2007). Also, activation of
176 FGFR2IIIb inhibits human chorionic gonadotropin (hCG)-induced progesterone secretion by
177 bovine and rat granulosa cells (PARROTT & SKINNER, 1998). Nevertheless, the mechanism
178 of this inhibitory action on steroidogenesis still remains unknown. We cannot exclude the

179 possibility of an interaction between theca and granulosa cells with other factors induced by
180 FGF10. The activation of FGF10 receptors can down-regulate the expression of AT2
181 receptors in granulosa and theca cells (PORTELA et al., 2008; BERISHA et al., 2002)
182 decreasing AngII receptor signaling required for meiotic resumption of bovine oocyte
183 (BARRETA et al., 2008).

184 PELUSO (2006) related an inhibitory action of FGF2 on meiotic resumption of mice
185 oocytes co-cultured with granulosa cells, suggesting that activation of FGFRs is involved in
186 the blockage of oocyte nuclear maturation. Another evidence of a role of FGFs in inhibition
187 of meiotic resumption is the fact that in humans the expression of FGF7, which activates the
188 same receptor of FGF10 (FGFR2IIIb), is induced by cyclic adenosine monophosphate
189 (cAMP; GRAEFF et al., 1999), a factor known to be involved in meiotic resumption blockage
190 (AKTAS et al., 2003).

191 The addition of FGF10 to the maturation medium did not have an effect on meiotic
192 resumption inhibited by follicular cells. This result evidences that FGF10 does not have a
193 positive or negative effect on granulosa and theca cells. In the absence of follicular cells,
194 FGF10 did not affect meiotic resumption rate. The rates of germinal vesicle breakdown
195 obtained after 7h of culture were similar to those previously described by others (SIRARD &
196 FIRST, 1988). These results suggest that FGF10 is inhibiting GVBD by acting on the
197 follicular wall cells, despite cumulus cells also express FGF10 receptors (CHO et al., 2008).

198 Angiotensin II was used at the dose of 10^{-11} M since previous studies showed that this
199 dose was the most effective in inducing the bovine oocyte meiotic resumption (GIOMETTI et
200 al., 2005; BENETTI et al., 2008). The rationale for the concentration of 100ng mL^{-1} of FGF10
201 used in the second experiment was based on the experiment of dose response, which showed
202 that doses between 10 and 1000ng mL^{-1} FGF10 were efficient on inhibiting AngII-induced
203 meiotic resumption. Also, it was based on previous study, which showed that 100ng mL^{-1} of
204 FGF10 decreases estradiol secretion with no effect on follicular cell proliferation and

205 viability, arguing against a possible toxic effect of FGF10 (BURATINI et al., 2007). The dose
206 of 100ng mL⁻¹ progesterone was chosen based on a previously dose-response performed in
207 our laboratory (BOHRER et al., 2008).

208 Taken together, the results of different studies allow us to propose a model in which
209 AngII mediates the LH surge-induced meiotic resumption through a stimulatory effect on
210 progesterone and prostaglandins synthesis. Thus, FGF10 can exert its negative effect down-
211 regulating AT2 expression and, consequently, decreasing AngII-stimulated progesterone
212 synthesis or directly inhibiting follicular cell steroidogenesis. Nevertheless, further studies are
213 necessary to elucidate the role of FGF10 on bovine oocyte nuclear maturation.

214 CONCLUSION

215 In a co-culture model of oocytes and follicular cells, we showed that FGF10 interacted
216 with follicular cells to inhibit meiotic resumption induced by AngII but not by progesterone in
217 bovine oocytes. It was further demonstrated that progesterone effect on meiotic resumption is
218 mediated through cyclooxygenase pathway.

219 SOURCES OF MANUFACTURES

220 ^aSigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA

221 ^bNunc, Roskilde, Denmark

222 ^cGibco Labs., Grand Island, NY, USA

223 ^dBioniche, Belleville, Ontario, Canada

224 ^eMerck KG, Darmstadt, Germany

225 ^fPeprotech, Rocky Hill, NJ, USA

226 REFERENCES

227 ACOSTA, T.J. et al. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide
228 system in bovine mature follicles *in vitro*: effects on steroid hormones and prostaglandin
229 secretion. **Biology of Reproduction**, v.61, n.6, p.1419-1425, 1999.

- 230 AKTAS, H. et al. Meiotic state of bovine oocytes is regulated by interactions between cAMP,
231 cumulus, and granulosa. **Molecular Reproduction and Development**, v.65, n.3, p.336-343,
232 2003.
- 233 AYALON, D. et al. Serum gonadotrophin levels in pro-oestrous rats in relation to the
234 resumption of meiosis by the oocytes. **Reproduction**, v.31, n.1, p.51-58, 1972.
- 235 BARRETA, M. et al. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear
236 maturation is mediated by prostaglandins E2 and F2alpha. **Reproduction**, v.136, n.6, p.733-
237 740, 2008.
- 238 BENETTI, L. et al. Meiosis resumption in bovine oocytes induced by angiotensin II is
239 mediated through AT2 receptors. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL
240 BIOLOGY OF REPRODUCTION, II., 2008, São Paulo, Brasil. **Proceedings...** Belo
241 Horizonte : Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2009. v.1. 368p. p.266.
- 242 BERISHA, B. et al. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and
243 basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. **Journal of**
244 **Endocrinology**, v.167, n.3, p.371-382, 2000.
- 245 BERISHA, B. et al. The mRNA expression of angiotensin and endothelin system members in
246 bovine ovarian follicles during final follicular growth. **Journal of Reproduction and**
247 **Development**, v.48, n.6, p.573-582, 2002.
- 248 BERISHA, B. et al. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family
249 members during the final growth of bovine ovarian follicles. **Molecular Reproduction and**
250 **Development**, v.67, n.2, p.162-171, 2004.
- 251 BOHRER, R. et al. Progesterone-induced bovine oocyte nuclear maturation is mediated by
252 the COX pathway. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BIOLOGY OF
253 REPRODUCTION, II., 2008, São Paulo, Brasil. **Proceedings...** Belo Horizonte : Colégio
254 Brasileiro de Reprodução Animal, 2009. v.1. 368p. p.270.
- 255 BRIDGES, P.J. et al. Gonadotropin-induced expression of messenger ribonucleic acid for

- 256 cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins E and F2 α in bovine preovulatory
257 follicles are regulated by the progesterone receptor. **Endocrinology**, v.147, n.10, p.4713-
258 4722, 2006.
- 259 BURATINI, J. et al. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor,
260 fibroblast growth factor receptor 2b, in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v.77, n.4,
261 p.743-750, 2007.
- 262 CASTILHOS, A.C. et al. Expression of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast
263 growth factor receptor 2b, in the bovine corpus luteum. **Molecular Reproduction and**
264 **Development**, v.75, n.5, p.940-945, 2008.
- 265 CHO, J. et al. Fibroblast growth factor 7 stimulates *in vitro* growth of oocytes originating
266 from bovine early antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v.75, n.12,
267 p.1736-1743, 2008.
- 268 GASPERIN, B. G. et al. Dominant follicle growth is interrupted by intrafollicular injection of
269 FGF10 in cattle. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BIOLOGY OF
270 REPRODUCTION, II., 2008, São Paulo, Brasil. **Proceedings...** Belo Horizonte : Colégio
271 Brasileiro de Reprodução Animal, 2009. v.1. 368p. p.203.
- 272 GIOMETTI, I.C. et al. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells
273 on bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v.63, n.4, p.1014-1025, 2005.
- 274 GOTOH, Y. et al. *In vitro* effects on microtubule dynamics of purified *Xenopus* M phase-
275 activated MAP kinase. **Nature**, v.349, n.6306, p.251-254, 1991.
- 276 GRAEFF, R.W. et al. KGF and FGF-10 stimulate liquid secretion in human fetal lung.
277 **Pediatric Research**, v.46, n.5, p.523-529, 1999.
- 278 LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. Effects of divalent cations on *in vitro* maturation of bovine
279 oocytes. **Journal of Experimental Zoology**, v.210, n.3, p.575-580, 1979.
- 280 MORRIS, R.S. et al. Angiotensin II (AII) modulation of steroidogenesis by luteinized
281 granulosa cells *in vitro*. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.11, n.3, p.117-

- 282 122, 1994.
- 283 NILSSON, E. et al. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development
284 and initiates folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.175, n.1-2, p.123-
285 130, 2001.
- 286 PARROTT, J.A.; SKINNER, M.K. Developmental and hormonal regulation of keratinocyte
287 growth factor expression and action in the ovarian follicle. **Endocrinology**, v.139, n.1, p.228-
288 235, 1998.
- 289 PELUSO, J.J. N-cadherin mediated cell contact inhibits germinal vesicle breakdown in mouse
290 oocytes maintained *in vitro*. **Reproduction**, v.131, n.3, p.429-437, 2006.
- 291 PINCUS, G.; ENZMANN, E. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in*
292 *vitro*. **Journal of Experimental Medicine**, v.62, n.5, p.665-675, 1935.
- 293 PORTELA, V.M. et al. Regulation of angiotensin type 2 receptor in bovine granulosa cells.
294 **Endocrinology**, v.149, n.10, p.5004-5011, 2008.
- 295 SIRARD, M.A.; FIRST, N.L. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine.
296 **Biology of Reproduction**, v.39, n.2, p.229-234, 1988.
- 297 SIROTKIN, A.V. Involvement of steroid hormones in bovine oocytes matured *in vitro*.
298 **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.41, n.3-8, p.855-858, 1992.
- 299

300 **FIGURE LEGENDS**

301 **Figure 1** - Effect of different concentrations of FGF10 on AngII-induced meiotic resumption
302 of oocytes co-cultured with follicular hemisections for 7h. Oocytes were co-culture with
303 follicular cells with angiotensin II at 10^{-11} M and fibroblast growth factor 10 at 0, 10, 100, or
304 1000ng mL^{-1} . The experiment was carried out in three replicates. Different letters indicate
305 statistical significance ($P \leq 0.05$) between groups. The number of oocytes examined in each
306 treatment is shown at the base of each bar.

307 **Figure 2** - Meiosis resumption of bovine oocytes cultured for 7h with or without follicular
308 hemisections treated with fibroblast growth factor 10 and/or angiotensin II. Cumulus-oocyte
309 complexes were cultured for 7h with or without follicular hemisections treated with fibroblast
310 growth factor 10 (FGF10) and/or angiotensin II (AngII). Different letters indicate statistical
311 significance ($P \leq 0.05$) between groups. The number of oocytes examined in each treatment is
312 shown at the base of each bar.

313 **Figure 3** - Meiotic resumption after co-culture of bovine oocytes and follicular hemisections
314 treated with progesterone (P4), P4+fibroblast growth factor 10 (FGF10) or P4+indomethacin
315 (indo) for 7h. Different letters indicate statistical significance ($P \leq 0.05$) between groups. The
316 number of oocytes examined in each treatment is shown at the base of each bar.

Figure 1

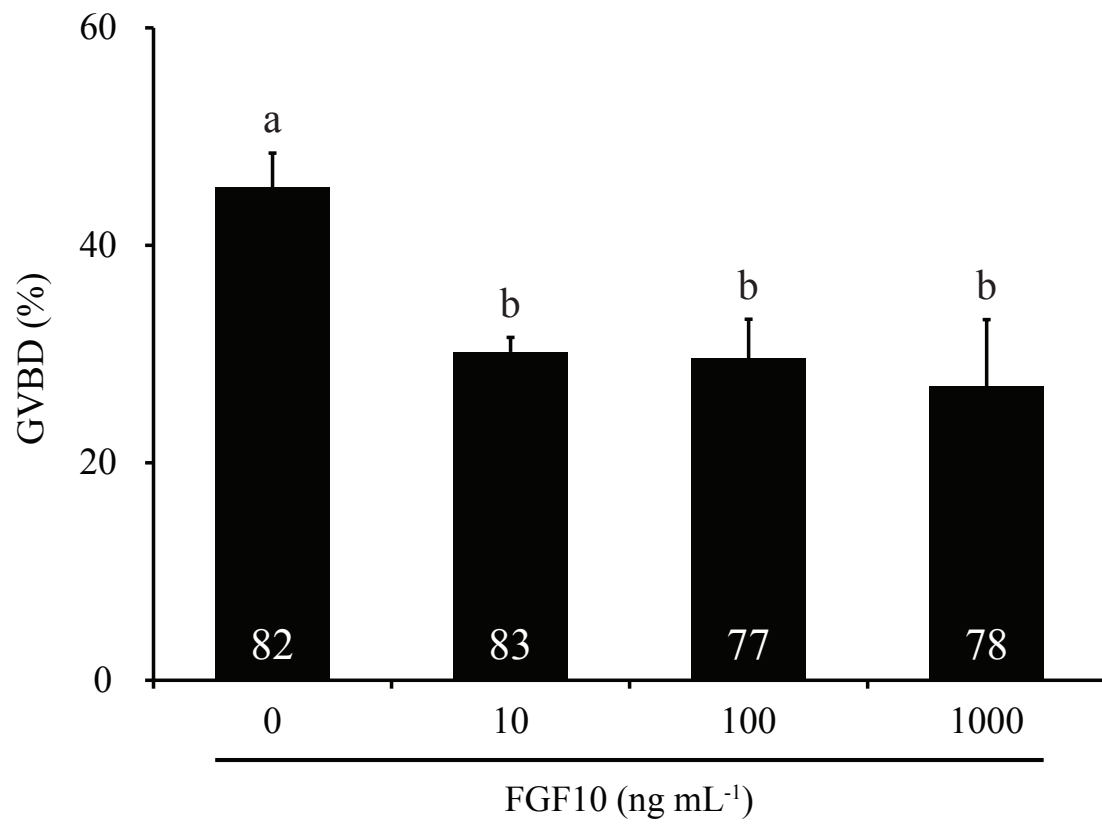


Figure 2

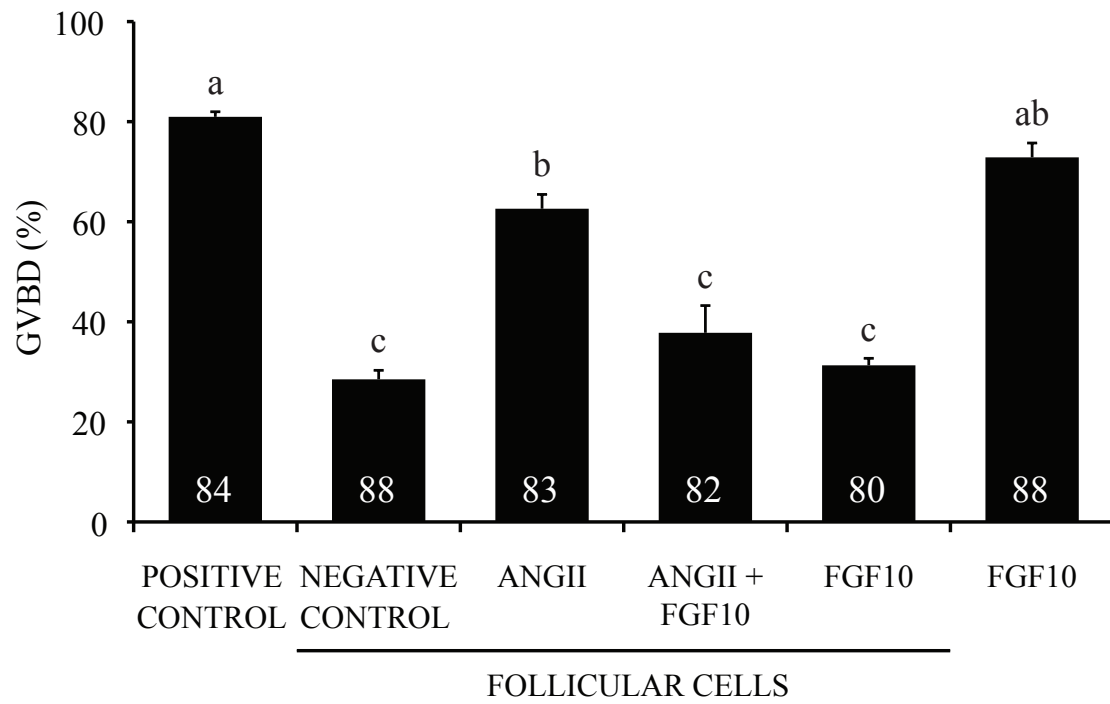
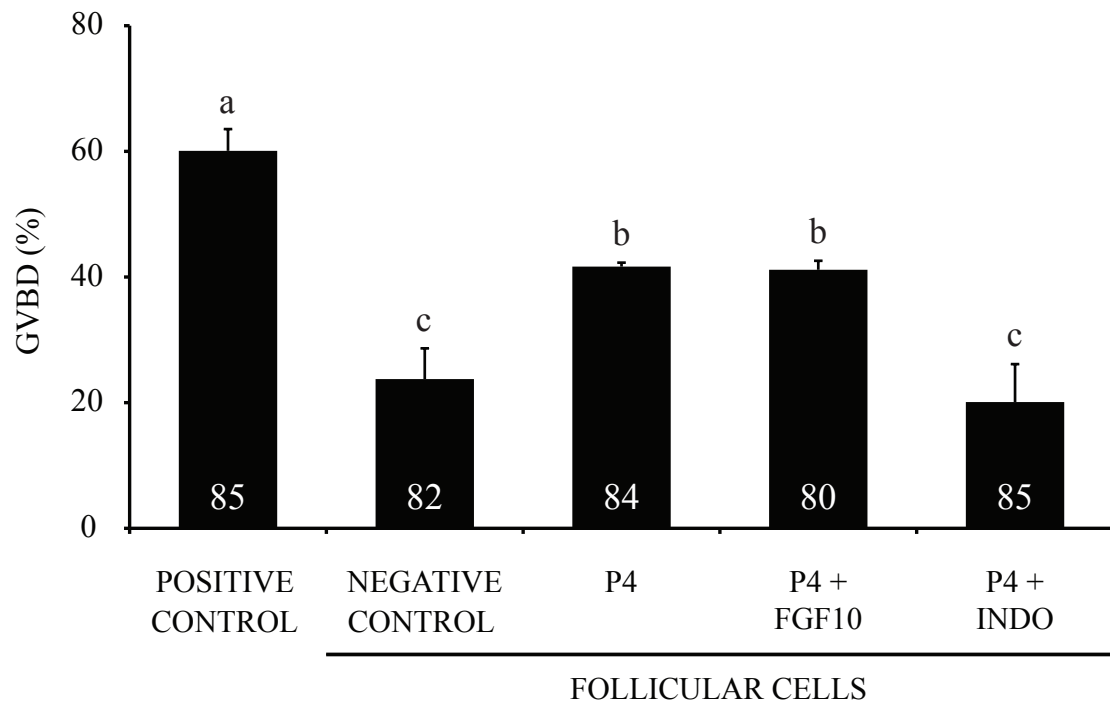


Figure 3



5. DISCUSSÃO

No primeiro estudo, demonstrou-se que a adição de água entre os poços de placas de cultivo possibilita a manutenção da osmolalidade dos meios, o que representa uma ótima alternativa ao uso de óleo em sistemas de cultivo. Efeitos negativos da presença de óleo em sistemas de maturação *in vitro* de oócitos já foram relatados, relacionados à migração de constituintes lipofílicos dos meios, como os esteróides, para a camada de óleo (SHIMADA et al., 2002; REINSBERG et al., 2004). O co-cultivo de oócitos e células foliculares tem sido um bom modelo experimental para estudar a interação entre células foliculares e maturação do oócito. Neste sistema, as células da granulosa, teca e cumulus mantêm a atividade esteroidogênica, estimulada pela adição de gonadotrofinas ao meio de cultivo (KOMAR et al., 2001). WANG et al. (2006) demonstraram que a síntese de esteróides é essencial durante a maturação de oócitos uma vez que o bloqueio da enzima responsável pela clivagem da cadeia lateral do colesterol causa uma forte inibição na maturação nuclear de oócitos bovinos. Além de evitar a perda de constituintes lipofílicos, o novo sistema proposto também permite a adição de componentes hidrofóbicos, como a progesterona, aos meios de cultivo de oócitos e embriões.

Os fatores envolvidos na inibição bem como na indução do reinício da meiose de oócitos bovinos não foram totalmente identificados. Durante o período em que o oócito está incluso no interior do folículo, a inibição do reinício da divisão meiótica é promovida por fatores secretados pelas células foliculares. Os fatores de crescimento associados ao EGF, as prostaglandinas, a angiotensina II e esteróides como a progesterona já foram identificados como mediadores do LH na expansão das células do cumulus e maturação do oócito nas diferentes espécies. Nosso grupo demonstrou que a AngII é um importante mediador do LH na indução do reinício da meiose de oócitos bovinos, atuando através de receptores AT2 (BARRETA et al., 2008; BENETTI et al., 2008). A suplementação de AngII em co-cultivo de oócitos e metades foliculares é capaz de reverter o efeito inibitório das células foliculares sobre o reinício da meiose (GIOMETTI et al., 2005). Além disso, o bloqueio não seletivo de receptores de AngII através da injeção intrafolicular de saralasin é capaz de inibir o reinício da meiose induzido por uma injeção intramuscular de GnRH (BARRETA et al., 2008). O fato do efeito da AngII ser mediado por prostaglandina E e F_{2α}, eicosanóides lipossolúveis, e, possivelmente progesterona, reforça a necessidade da utilização de um sistema de cultivo livre de óleo para o estudo da maturação nuclear.

Estudos realizados em cultivos de células da granulosa demonstraram que a adição de FGF10 inibe a expressão de receptores AT2 (PORTELA et al., 2008) e que a ativação dos receptores do FGF10 (FGFR2IIIB) inibe a secreção de progesterona estimulada por hCG (PARROTT & SKINNER, 1998). Além disso, em camundongos, a ativação dos FGFRs está envolvida na manutenção do oócito em VG (PELUSO et al., 2006). No presente estudo, demonstramos pela primeira vez uma participação do FGF10 na regulação do reinício da meiose de oócitos bovino. A adição de FGF10 em co-cultivo de oócitos e células foliculares inibiu o reinício da meiose induzido pela AngII. Na ausência de AngII no meio de cultivo, o FGF10 não alterou as taxas de RVG de CCOs cultivados na ausência de células foliculares nem a porcentagem de oócitos que permaneceram em VG após co-cultivo com células. Estes resultados demonstram que o efeito do FGF10 na maturação nuclear de oócitos é mediado pelas células foliculares. A expressão de receptores de AngII foi demonstrada nas células da teca e granulosa (BERISHA et al., 2002), não tendo sido relatada nas células do cumulus, o que corrobora com nossos achados. Entretanto, não pode ser descartado um efeito inibitório da ativação dos receptores FGFR2IIIB sobre a esteroidogênese como já foi demonstrado (PARROTT & SKINNER, 1998).

A participação da progesterona no reinício da meiose já foi demonstrada em outras espécies (BAYAA et al., 2000; SHIMADA & TERADA, 2002; BORMAN et al., 2004). Em bovinos, SIROTKIN (1992) demonstrou que a progesterona é capaz de estimular o reinício da meiose e maturação de oócitos bovinos *in vitro* na ausência de inibidores. A adição de FGF10 em co-cultivo de oócitos e metades foliculares não inibiu o reinício da meiose induzido pela progesterona. Estes dados sugerem que a ação do FGF10 pode ser resultante da inibição da expressão de receptores AT2, ou diretamente inibindo a esteroidogênese das células foliculares.

A adição de indometacina ao meio de cultivo bloqueou o efeito positivo da progesterona. Como já foi demonstrado anteriormente, a rota das ciclooxigenases está envolvida na ação da AngII no reinício da meiose (BARRETA et al., 2008) e a administração de AngII em folículos pré-ovulatórios bovinos estimula a síntese de progesterona nas células foliculares (ACOSTA et al., 1999). Além disso, o pico ovulatório de LH está associado a dois picos de produção de progesterona e com o aumento na expressão de receptores deste esteróide e de receptores de prostaglandinas nas células foliculares bovinas (ROBERT et al., 2001; JO et al., 2001). Portanto, diante das inúmeras evidências, podemos inferir que o aumento de AngII e receptores AT2 induzidos pelo pico de LH estimulam a síntese de progesterona e prostaglandinas, promovendo o reinício da meiose, expansão do cumulus e

ovulação em bovinos. Entretanto, são necessários mais estudos para determinar se estes fatores atuam na mesma rota ou se desempenham funções redundantes na promoção dos eventos estimulados pelo pico de LH.

6. CONCLUSÃO

Os dados de osmolalidade e desenvolvimento embrionário obtidos demonstram que a adição de água entre os poços de placas de cultivo pode ser uma boa alternativa para substituir o óleo na experimentação científica bem como na produção *in vitro* de embriões. Este sistema evita perdas de constituintes dos meios para o óleo e possibilita a adição de substâncias lipossolúveis aos meios de cultivo.

Utilizando um sistema de co-cultivo *in vitro* de oócitos e metades foliculares demonstrou-se que o fator de crescimento fibroblástico 10 inibe o reinício da meiose induzido pela angiotensina II, atuando através das células foliculares, porém não afeta o reinício da meiose induzido pela progesterona. O efeito positivo da progesterona no reinício da meiose de oócitos bovinos cultivados na presença de células foliculares é mediado pela rota das ciclooxigenases. Estes resultados sugerem que a AngII e a progesterona podem utilizar a mesma via para induzir o reinício da meiose de oócitos bovinos e que a ação da AngII e do FGF10 precedem a sinalização dos receptores de progesterona.

7. REFERÊNCIAS

ACOSTA, T. J. et al. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles *in vitro*: effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 6, p. 1419-1425, 1999.

ACOSTA, T. J. et al. Periovulatory changes in the local release of vasoactive peptides, prostaglandin F_{2α}, and steroid hormones from bovine mature follicles *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 5, p. 1253-1261, 2000.

ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 127-140, 2004.

AKTAS, H.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; FIRST, N. L. Meiotic state of bovine oocytes is regulated by interactions between cAMP, cumulus, and granulosa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 65, n. 3, p. 336-343, 2003.

AYALON, D. et al. Serum gonadotrophin levels in pro-oestrous rats in relation to the resumption of meiosis by the oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 31, n. 1, p. 51-58, 1972.

BALTAR, A. E. S.; OLIVEIRA, M. A. L.; CATANHO, M. T. J. Bovine cumulus/oocyte complex: quantification of LH/hCG receptors. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 4, p. 433-437, 2000.

BAO, B. et al. Expression of messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding 3β-hydroxysteroid dehydrogenase Δ⁴, Δ⁵ isomerase (3β-HSD) during recruitment and selection of bovine ovarian follicles: identification of dominant follicles by expression of 3β-HSD mRNA within the granulosa cell layer. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 6, p. 1466-1473, 1997.

BAO, B.; GARVERICK, H. A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 7, p. 1903-1921, 1998.

BARRETA, M. et al. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E₂ and F_{2α}. **Reproduction**, v. 136, n. 6, p. 733-740, 2008.

BAYAA, M. et al. The classical progesterone receptor mediates *Xenopus* oocyte maturation through a nongenomic mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 23, p. 12607-12612, 2000.

BENETTI, L. et al. Meiosis resumption in bovine oocytes induced by angiotensin II is mediated through AT2 receptors. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION, 2., 2008, São Paulo. **Proceedings...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2009. p. 266.

BERISHA, B. et al. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. **Journal of Endocrinology**, v. 167, n. 3, p. 371-382, 2000.

BERISHA, B.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. The mRNA expression of angiotensin and endothelin system members in bovine ovarian follicles during final follicular growth. **Journal of Reproduction and Development**, v. 48, n. 6, p. 573-582, 2002.

BERISHA, B.; SINOWATZ, F.; SCHAMS, D. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 67, n. 2, p. 162-171, 2004.

BERISHA, B. et al. Expression of fibroblast growth factor 1 (FGF1) and FGF7 in mature follicles during the periovulatory period after GnRH in the cow. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 2, p. 307-313, 2006.

BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 60, n. 9, p. 1679-1690, 2003.

BOHRER, R. et al. Progesterone-induced bovine oocyte nuclear maturation is mediated by the COX pathway. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION, 2., 2008, São Paulo, Brasil. **Proceedings...** Belo Horizonte : Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2009. p. 270.

BORMAN, S. M. et al. Progesterone promotes oocyte maturation, but not ovulation, in nonhuman primate follicles without a gonadotropin surge. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 1, p. 366-373, 2004.

BOTTARI, S. P. et al. The angiotensin AT2 receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 183, n. 1, p. 206-211, 1992.

BRIDGES, P. J.; KOMAR, C. M.; FORTUNE, J. E. Gonadotropin-induced expression of messenger ribonucleic acid for cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins E and F_{2α} in bovine preovulatory follicles are regulated by the progesterone receptor. **Endocrinology**, v. 147, n. 10, p. 4713-4722, 2006.

BRIDGES, P. J.; FORTUNE, J. E. Regulation, action and transport of prostaglandins during the periovulatory period in cattle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 263, n. 1-2, p. 1-9, 2007.

BRINSTER, R. L. *In vitro* culture of mammalian embryos. **Journal of Animal Science**, v. 27, p. 1-14, 1968.

BRUNSWIG-SPICKENHEIER, B.; MUKHOPADHYAY, A. K. Characterization of angiotensin-II receptor subtype on bovine thecal cells and its regulation by luteinizing hormone. **Endocrinology**, v. 131, n. 3, p. 1445-1452, 1992.

BURATINI J. et al. Expressão gênica do fator de crescimento fibroblástico 10 (FGF-10) em folículos antrais bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 18., 2004, Barra Bonita. **Proceedings...** Porto Alegre : Acta Scientiae Veterinariae, 2004. p. 139.

BURATINI, J. et al. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. **Reproduction**, v. 130, n. 3, p. 343-350, 2005.

BURATINI, J. et al. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2b, in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 4, p. 743-750, 2007.

BURG, M. B.; FERRARIS, J. D.; DMITRIEVA, N. I. Cellular response to hyperosmotic stresses. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 4, p. 1441-1474, 2007.

BYSKOV, A. G.; ANDERSEN, C. Y.; LEONARDBSEN, L. Role of meiosis activating sterols, MAS, in induced oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, n. 1-2, p. 189-196, 2002.

CASTILHO, A. C. et al. Expression of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2b, in the bovine corpus luteum. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 5, p. 940-945, 2008a.

CASTILHO, A. C. et al. Fibroblast growth factor 10 (FGF-10) mRNA expression around follicular deviation in *Bos indicus* heifers. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION, 2., 2008, São Paulo. **Proceedings...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2009b. p. 218.

CHEN, C.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Fibroblast growth factor-10: A stromal mediator of epithelial function in the ovine uterus. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 3, p. 959-966, 2000.

CHO, J. et al. Fibroblast growth factor 7 stimulates *in vitro* growth of oocytes originating from bovine early antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 12, p. 1736-1743, 2008.

COOKE, F. N. T. et al. Several fibroblast growth factors are expressed during pre-attachment bovine conceptus development and regulate interferon-tau expression from trophectoderm. **Reproduction**, 2008 (in press).

COUGHLIN, S. R. et al. Acidic and basic fibroblast growth factors stimulate tyrosine kinase activity *in vivo*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 2, p. 988-993, 1988.

DINH, D. T. et al. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. **Clinical Science**, v. 100, n. 5, p. 481-492, 2001.

DODE, M. A. N.; GRAVES, C. Involvement of steroid hormones on *in vitro* maturation of pig oocytes. **Theriogenology**, v. 57, n. 2, p. 811-821, 2002.

ERBACH, G. T. et al. Zinc is a possible toxic contaminant of silicone oil in microdrop cultures of preimplantation mouse embryos. **Human Reproduction**, v. 10, n. 12, p. 3248-3254, 1995.

FAIR, T. et al. Global gene expression analysis during bovine oocyte *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v. 68, p. 91-97, 2007.

FERREIRA, R. et al. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**, v. 134, n. 5, p. 713-719, 2007.

FERREIRA, R. et al. The role of angiotensin II in bovine follicular growth. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR THE STUDY OF REPRODUCTION, 41., 2008, Kona. **Proceedings...** Madison : Society for the Study of Reproduction, 2008. p. 240.

FEUGANG, J. M.; CAMARGO-RODRÍGUEZ, O.; MEMILI, E. Culture systems for bovine embryos. **Livestock Science**, 2008 (in press).

FISSORE, R. A.; HE, C. L.; WOUDE, F. V. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1261-1270, 1996.

FORTUNE, J. E.; HANSEL, W. Concentrations of steroids and gonadotropins in follicular fluid from normal heifers and heifers primed for superovulation. **Biology of Reproduction**, v. 32, n. 5, p. 1069-1079, 1985.

GASPERIN, B. G. et al. Dominant follicle growth is interrupted by intrafollicular injection of FGF10 in cattle. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION, 2., 2008, São Paulo, Brasil. **Proceedings...** Belo Horizonte : Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2009. v.1. 368p. p. 203.

GIOMETTI, I. C. et al. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v. 63, n. 4, p. 1014-1025, 2005.

GONÇALVES, P. B. D. et al. Novo papel da angiotensina II no mecanismo de maturação de oócitos, desenvolvimento folicular e ovulação em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, p. 85-92, 2006.

GORDO, A. C. et al. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 59, n. 1, p. 106-114, 2001.

GOTOH, Y. et al. *In vitro* effects on microtubule dynamics of purified *Xenopus* M phase-activated MAP kinase. **Nature**, v. 349, n. 6306, p. 251-254, 1991.

GRAEFF, R. W.; WANG, G.; McCRAY, P. B. KGF and FGF-10 stimulate liquid secretion in human fetal lung. **Pediatric Research**, v. 46, n. 5, p. 523-529, 1999.

HAGEMANN, A. et al. Prorenin and active renin concentrations in ovarian follicular fluid increase after the LH peak in superovulated heifers. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 21, n. 8, p. 639-648, 1994.

HUSAIN, A. et al. Localization of angiotensin II receptors in ovarian follicles and the identification of angiotensin II in rat ovaries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 8, p. 2489-2493, 1987.

HWANG, I. et al. Osmolarity at early culture stage affects development and expression of apoptosis related genes (Bax-a and Bcl-xl) in pre-implantation porcine NT embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 3, p. 464-471, 2008.

IGARASHI, M.; FINCH, P. W.; AARONSON, S. A. Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF)-10 reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 21, p. 13230-13235, 1998.

ITOH, N.; ORNITZ, D. M. Evolution of the FGF and FGFR gene families. **Trends in Genetics**, v. 20, n. 11, p. 563-569, 2004.

JO, M.; KOMAR, C. M.; FORTUNE, J. E. Gonadotropin surge induces two separate increases in messenger RNA for progesterone receptor in bovine preovulatory follicles. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 6, p. 1981-1988, 2002.

JOHNSON, M. C. et al. Regulatory role of angiotensin II on progesterone production by cultured human granulosa cells. Expression of angiotensin II type-2 receptor. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, n. 8, p. 663-668, 1997.

KIM, B. et al. Effect of medium milieu on sperm penetration and pronuclear formation of bovine oocytes matured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 57, n. 8, p. 2093-2104, 2002.

KOBAYASHI, S. I. et al. Intraluteal release of angiotensin II and progesterone *in vivo* during corpora lutea development in the cow: effect of vasoactive peptides. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 1, p. 174-179, 2002.

KOMAR, C. M. et al. Decline in circulating estradiol during the periovulatory period is correlated with decreases in estradiol and androgen, and in messenger RNA for P450

aromatase and P450 17 α -Hydroxylase, in bovine preovulatory follicles. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 6, p. 1797-1805, 2001.

KRISCHEK, C.; MEINECKE, B. *In vitro* maturation of bovine oocytes requires polyadenylation of mRNAs coding proteins for chromatin condensation, spindle assembly, MPF and MAP kinase activation. **Animal Reproduction Science**, v. 73, n. 3, p. 129-140, 2002.

KRUGER, T. F. et al. Osmolarity studies with different containers and volumes in a human *in vitro* fertilization programme. **South African Medical Journal**, v. 68, n. 9, p. 651-652, 1985.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 1, p. 76-86, 1979.

LINCOLN, A. J. et al. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. **Nature Genetics**, v. 30, n. 4, p. 446-449, 2002.

LIU, Z.; FOOTE, R. H. Sodium chloride, osmolyte, and osmolarity effects on blastocyst formation in bovine embryos produced by *in vitro* fertilization (IVF) and cultured in simple serum-free media. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 13, n. 7, p. 562-568, 1996.

MIN, H. et al. FGF-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarities to *Drosophila* branches. **Genes & Development**, v. 12, p. 3156-3161, 1998.

MINGOTI, G. Z.; GARCIA, J. M.; ROSA-E-SILVA, A. A. M. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured *in vitro* with BSA and different concentrations of steroids. **Animal Reproduction Science**, v. 69, n. 3-4, p. 175-186, 2002.

MORRIS, R. S. et al. Angiotensin II (AII) modulation of steroidogenesis by luteinized granulosa cells *in vitro*. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 11, n. 3, p. 117-122, 1994.

MOTOLA, S.; POPLIKER, M.; TSAFRIRI, A. Are steroids obligatory mediators of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin-triggered resumption of meiosis in mammals? **Endocrinology**, v. 148, n. 9, p. 4458-4465, 2007.

NGUYEN, V. T. et al. Stage-specific effects of the osmolarity of a culture medium on the development of parthenogenetic diploids in the pig. **Theriogenology**, v. 59, n. 3-4, p. 719-734, 2003.

NIELSEN, A. H. et al. Angiotensin converting enzyme in bovine ovarian follicular fluid and its relationship with oestradiol and progesterone. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n. 2, p. 81-85, 2002.

NILSSON, E.; PARROT, J. A.; SKINNER, M. K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 175, n. 1-2, p. 123-130, 2001.

NUTTINCK, F. et al. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus–oocyte complexes during oocyte maturation. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 27, n. 2, p. 179-195, 2004.

NUTTINCK, F. et al. Expression of genes involved in prostaglandin E2 and progesterone production in bovine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation and fertilization. **Reproduction**, v. 135, n. 5, p. 593-603, 2008.

OHKUBO, H. et al. Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 1, p. 319-323, 1986.

OKAZAKI, T. et al. LH reduces proliferative activity of cumulus cells and accelerates GVBD of porcine oocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 209, n. 1-2, p. 43-50, 2003.

OTOI, T. et al. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. **Theriogenology**, v. 48, n. 5, p. 769-774, 1997.

OTSUKI, J.; NAGAI, Y.; CHIBA, K. Damage of embryo development caused by peroxidized mineral oil and its association with albumin in culture. **Fertility and Sterility**, 2008 (in press).

PARK, J. Y. et al. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v. 303, n. 5658, p. 682-684, 2004.

PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Developmental and hormonal regulation of keratinocyte growth factor expression and action in the ovarian follicle. **Endocrinology**, v. 139, n. 1, p. 228-235, 1998.

PARRISH, J. J. et al. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 25, n. 4, p. 591-600, 1986.

PARRISH, J. J. et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 38, n. 5, p. 1171-1180, 1988.

PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Developmental and hormonal regulation of keratinocyte growth factor expression and action in the ovarian follicle. **Endocrinology**, v. 139, n. 1, p. 228-235, 1998.

PAUL, M.; MEHR, A. P.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 3, p. 747-803, 2006.

PELUSO, J. J. N-cadherin mediated cell contact inhibits germinal vesicle breakdown in mouse oocytes maintained *in vitro*. **Reproduction**, v. 131, n. 3, p. 429-437, 2006.

PINCUS, G.; ENZMANN, E. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 62, n. 5, p. 665-675, 1935.

PORTELA, V. M. et al. Regulation of angiotensin type 2 receptor in bovine granulosa cells. **Endocrinology**, v. 149, n. 10, p. 5004-5011, 2008.

REINSBERG, J.; ACKERMANN, D.; VAN DER VEN, H. Pitfalls in assessment of progesterone production by granulosa cells cultured in contact with silicone rubber or paraffin oil. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 270, n. 3, p. 174-178, 2004.

RICHARD, F. J.; SIRARD, M. A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. I: Effects of follicular hemisections on bovine oocyte maturation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 1, p. 16-21, 1996.

RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 2, p. 234-248, 2002.

ROBERT, C. et al. Differential display and suppressive subtractive hybridization used to identify granulosa cell messenger RNA associated with bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 6, p. 1812-1820, 2001.

ROH, S. et al. Improved monospermic fertilization and subsequent blastocyst formation of bovine oocytes fertilized *in vitro* in a medium containing NaCl of decreased concentration. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 8, p. 667-671, 2002.

ROH, S.; CHOI, Y. J.; MIN, B. M. A novel microtube culture system that enhances the *in vitro* development of parthenogenetic murine embryos. **Theriogenology**, v. 69, n. 2, p. 262-267, 2008.

ROMERO, S.; SMITZ, J. Improvement of *in vitro* culture of mouse cumulus-oocyte complexes using PDE3-inhibitor followed by meiosis induction with epiregulin. **Fertility and Sterility**, 2008 (in press).

SATTERFIELD, M. C. et al. Progesterone regulates FGF10, MET, IGFBP1, and IGFBP3 in the endometrium of the ovine uterus. **Biology of Reproduction**, v. 79, n. 6, p. 1226-1236, 2008.

SCHOENFELDER, M.; SCHAMS, D.; EINSPANIER, R. Steroidogenesis during *in vitro* maturation of bovine cumulus oocyte complexes and possible effects of tri-butyltin on granulosa cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 84, n. 2, p. 291-300, 2003.

SEKINE, K. et al. FGF-10 is essential for limb and lung formation. **Nature Genetics**, v. 21, n. 1, p. 138-141, 1999.

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

SHIMADA, M.; KAWANO, N.; TERADA, T. Delay of nuclear maturation and reduction in developmental competence of pig oocytes after mineral oil overlay of *in vitro* maturation media. **Reproduction**, v. 124, n. 4, p. 557-564, 2002.

SHIMADA, M. et al. Expression of two progesterone receptor isoforms in cumulus cells and their roles during meiotic resumption of porcine oocytes. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 33, n. 1, p. 209-225, 2004.

SHIMADA, M. et al. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 6, p. 1352-1365, 2006.

SILVA, C. C.; KNIGHT, P. G. Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 119, n. 2, p. 261-269, 2000.

SIRARD, M. A.; FIRST, N. L. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. **Biology of Reproduction**, v. 39, n. 2, p. 229-234, 1988.

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

SIROTKIN, A. V. Involvement of steroid hormones in bovine oocytes matured *in vitro*. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 3-8, p. 855-858, 1992.

STEFANELLO, J. R. et al. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. **Theriogenology**, v. 66, n. 9, p. 2068-2076, 2006.

TAKAHASI, K. et al. Protein tyrosine phosphatase inhibition by angiotensin-II in rat pheochromocytoma cells through type-2 receptor, AT2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 198, n. 1, p. 60-66, 1994.

TANIGUCHI, F. et al. Aberrant expression of keratinocyte growth factor receptor in ovarian surface epithelial cells of endometrioma. **Fertility and Sterility**, v. 89, n. 2, p. 478-480, 2008.

THOUAS, G. A.; JONES, G. M.; TROUNSON, A. O. The 'GO' system – a novel method of microculture for *in vitro* development of mouse zygotes to the blastocyst stage. **Reproduction**, v. 126, n. 2, p. 161-169, 2003.

VAJTA, G. et al. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the well of the well (WOW) system. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 3, p. 256-264, 2000.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, 2005.

VAN SOOM, A. et al. Silicone oil used in microdrop culture can affect bovine embryonic development and freezability. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, n. 3-4, p. 169-176, 2001.

VOSS, A. K.; FORTUNE, J. E. Levels of messenger ribonucleic acid for cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in bovine preovulatory follicles decrease after the luteinizing hormone surge. **Endocrinology**, v. 132, n. 2, p. 888-894, 1993.

WANG, H. et al. Studies of the role of steroid hormone in the regulation of oocyte maturation in cattle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p. 4-13, 2006.

WIESEN, J. F.; MIDGLEY, A. R. Changes in expression of connexin 43 gap junction messenger ribonucleic acid and protein during ovarian follicular growth. **Endocrinology**, v. 133, n. 2, p. 741-746, 1993.

WRIGHT, R. W.; BONDIOLI, K. R. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 3, p. 702-729, 1981.

WU, B. et al. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 1, p. 253-259, 1997.

YAMASAKI, M. et al. Structure and expression of the rat mRNA encoding a novel member of the fibroblast growth factor family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 27, p. 15918-15921, 1996.

YAMASHITA, Y. et al. Production of progesterone from de novo-synthesized cholesterol in cumulus cells and its physiological role during meiotic resumption of porcine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 4, p. 1193-1198, 2003.