

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico-CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso

**Nanoembriologia: suplementação com tretinoína
nanoencapsulada na maturação *in vitro* dos complexos
cumulus-oócitos bovinos**

Caroline Gomes Lucas

Pelotas, 2012

Caroline Gomes Lucas

**Nanoembriologia: suplementação com tretinoína nanoencapsulada na
maturação *in vitro* dos complexos *cumulus*-oócitosbovinos**

Trabalho acadêmico apresentado ao
Curso de Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial à obtenção do título
Bacharel em Biotecnologia.

Orientador acadêmico: Dr. Tiago Collares

Orientador de estágio: Dra. Priscila Marques Moura de Leon

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:
Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744

L933n Lucas, Caroline Gomes

Nanoembriologia : suplementação com tretinoína nanoencapsulada na maturação in vitro dos complexos cumulus-oócitosbovinos. / Caroline Gomes Lucas ; orientador acadêmico Tiago Collares ; orientador de estágio Priscila Marques Moura de Leon. Pelotas, 2012. 62f. : il - Monografia (Conclusão de Curso em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Tiago Collares, Universidade Federal de Pelotas

Prof. PhD. João Carlos Deschamps, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Fabiana Kömmling Seixas, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Vinicius Farias Campos, Universidade Federal de Pelotas

Aos meus pais, Mara e Gomercindo e ao meu irmão, Mateus, pelo incentivo incondicional, dedicação e apoio constante.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas conquistas alcançadas e por ter me concebido sabedoria e serenidade nos momentos difíceis.

Ao meu orientador Tiago Collares, por acreditar no meu trabalho, pelas cobranças e desafios impostos, que fizeram com que eu alcançasse o meu crescimento pessoal e profissional.

À Prof^a Fabiana Seixas, pela confiança e amizade, pelas oportunidades proporcionadas, pelo incentivo e conhecimentos adquiridos.

À minha co-orientadora Priscila de Leon, pelo companheirismo em todos os momentos, sempre incansável e pronta para enfrentar qualquer desafio. Uma profissional de competência e dedicação incontestáveis, um exemplo a ser seguido. Obrigada por todos os conselhos e ensinamentos transmitidos.

À Prof^a Sibeles Borsuk, pelos aprendizados durante os meus primeiros passos na vida acadêmica e por sempre estar disposta a explicar e solucionar qualquer questionamento.

Ao Prof. Ruy Beck e sua equipe, pelo fornecimento da tretinoína nanoencapsulada e da suspensão de nanocápsulas.

Aos meus colegas de curso pela amizade e convivência e em especial a Carolina Ximendes, Thaís Larré, Mariana Remião e Suélen Basgalupp que me acompanharam em todas etapas, pela cumplicidade, apoio e atenção em todos os momentos desta trajetória.

À minha amiga Cristina Haas pela ajuda, motivação e boas risadas regadas a um bom mate.

Aos meus companheiros de laboratório Luiza Nascentes, Delva Leão, Alexandre Bilhalva e William Domingues, pelo auxílio durante os experimentos.

À direção e aos funcionários do Grupo Marfrig e frigorífico Rollof pelo fornecimento dos ovários, viabilizando a realização deste trabalho.

À doutoranda Eliza Rossi, pela ajuda e paciência durante os ensinamentos técnicos da produção *in vitro* de embriões e à Eduarda Shultze, pelo auxílio na realização dos cálculos do delineamento experimental.

Ao Vinícius Campos, pelas opiniões e sugestões durante a realização deste trabalho e pelas contribuições em estatística.

Aos colegas do laboratório de Genômica Funcional e Embriologia Molecular e Transgênese Animal.

À minha família, pela formação que me propiciaram, pelo afeto, conselhos e compreensão.

A todos, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a execução deste trabalho e conclusão desta etapa.

Muito Obrigada!

“Nesta jornada terrena, aprende muito quem anda...”

Jayme Caetano Braum

RESUMO

LUCAS, Caroline Gomes. **Nanoembriologia: suplementação com tretinoína nanoencapsulada na maturação *in vitro* dos complexos *cumulus*-oócitos bovinos.** 2012. 62f. Monografia (Graduação)- Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A maturação oocitária é uma parte integrante do ciclo reprodutivo que permite gerar oócitos maduros capazes de sustentar o desenvolvimento pré-implantacional e completo de embriões. O melhoramento dos protocolos de maturação *in vitro* (MIV) através da suplementação com diferentes hormônios, vitaminas e outras moléculas, permite maior eficiência na fertilização e embriogênese. A suplementação com ácidos retinóicos (ARs) vem demonstrando efeito benéfico no processo de maturação citoplasmática, agindo no desenvolvimento inicial embrionário e competência oocitária. A tretinoína (TTN, ácido retinóico all-*trans* - ATRA) é um retinóide natural e metabólito ativo da vitamina A, que ainda é pouco estudado em relação à sua atividade e suplementação na MIV. A associação da tretinoína à nanopartículas poliméricas surge como alternativa para melhorar a solubilidade e estabilidade química da molécula, aumentando a eficiência do tratamento e possibilitando uma liberação controlada e a redução da degradação. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação com tretinoína nanoencapsulada (TTN-LCNC) nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1 μM , através da análise da expressão gênica de Mcl-1, SHC-1 e HAS-2, relacionados com o processo anti-apoptótico, de dano oxidativo e de síntese de ácido hialurônico (AH), respectivamente. Além disso, métodos de fluorescência para quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e avaliar a viabilidade e toxicidade celular foram realizados. Como principais resultados, TTN-LCNC a 0,25 μM aumentou a expressão de Mcl-1, SHC-1, HAS-2 nos oócitos, e de HAS-2 nas células do *cumulus* (CC). Ainda nas CC, a tretinoína livre (TNN) a 0,5 e 1 μM elevou os níveis de Mcl-1 e foi observado maior expressão de SHC-1 no controle maturado do que nos tratamentos, indicando equilíbrio do estresse oxidativo. A utilização de concentrações maiores de TTN e TTN-LCNC reduziram a produção de EROs. Os resultados sugerem que TTN-LCNC melhoram a capacidade de desenvolvimento durante a MIV de oócitos bovinos.

Palavras-chave: Oócitos bovinos; Maturação *in vitro*. Tretinoína. Nanocápsulas. Expressão Gênica.

ABSTRACT

LUCAS, Caroline Gomes. **Nanoembriologia: suplementação com tretinoína nanoencapsulada na maturação *in vitro* dos complexos cumulus-oócitos bovinos.** 2012. 62f. Monografia (Graduação)- Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The oocyte maturation is an integral part of the reproductive cycle to generate mature oocytes capable of sustaining the development and complete pre-implantation embryos. The improvement of *in vitro* maturation (IVM) protocols by supplementation with different hormones, vitamins and other molecules, allows for greater efficiency in fertilization and embryogenesis. The supplementation with retinoic acid (RA) has shown beneficial effect in the cytoplasmic maturation process, acting in the early embryogenesis and oocyte competence. Tretinoin (TTN, all-trans retinoic acid - ATRA) is a natural retinoid and active metabolite of vitamin A, which has been little studied in relation to their activity in IVM supplementation. The combination of tretinoin to the polymeric nanoparticles is an alternative to enhance the solubility and chemical stability of the molecule by increasing treatment efficiency and providing a controlled release and reduce degradation. The objective of this study was to evaluate the effects of supplementation with tretinoin nanocoated (TTN-LCNC) at concentrations of 0.25, 0.5 and 1 μ M, by analyzing Mcl-1, SHC-1 and HAS-2 genes expression, related with the anti-apoptotic process, oxidative damage and synthesis of hyaluronic acid (HA), respectively. In addition, fluorescence methods to quantify the production of reactive oxygen species (ROS) and assess the viability and cytotoxicity were performed. The main results TTN-LCNC to 0.25 μ M increased the expression of Mcl-1, SHC-1, HAS-2 in oocytes, and HAS-2 in cumulus cells (CC). Still in CC, free tretinoin (TTN) of 0.5 and 1 μ M increased the levels of Mcl-1 and was observed greater expression of SHC-1 in matured control than in treatments, indicating oxidative stress balance. The use of higher concentrations of TTN and TTN-LCNC reduced ROS production. This results suggest that TTN-LCNC enhance the ability of development during IVM bovine oocytes..

Keywords: Bovine oocytes, *In vitro* maturation (IVM). Tretinoin. Nanocapsules. Gene Expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Complexos <i>cumulus</i> -oócitos imaturos prévio a seleção e lavagem para a maturação <i>in vitro</i> e maturados <i>in vitro</i>	32
Figura 2	Efeitos da suplementação com TTN-LCNC na viabilidade e toxicidade celular de oócitos bovinos.....	40
Figura 3	Avaliação da viabilidade de membrana e citotoxicidade em oócitos maturados <i>in vitro</i> e oócitos imaturos.....	40
Figura 4	Produção de EROs nos tratamentos e grupos controles (maturados, imaturos e nanocápsulas).....	41
Figura 5	Formação de espécies reativas de oxigênio no grupo controle maturado (CM) e no grupo suplementado com tretinoína nanoencapsulada (TNN-LCNC) a 1 µM.....	42
Figura 6	Expressão gênica de Mcl-1, HAS-2 e SHC-1 nos oócitos submetidos aos tratamentos com TTN e TTN-LCNC.....	44
Figura 7	Expressão gênica de Mcl-1, HAS-2 e SHC-1 nas células do <i>cumulus</i> submetidas aos tratamentos com TTN e TTN-LCNC....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequências dos primers utilizados para qRT-PCR.....	35
Tabela 2	Taxa de maturação <i>in vitro</i> dos CCOs.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-UM- 4- metilumbeliferona
AH- ácido hialurônico
AMPc- monofosfato cíclico de adenosina
AR- ácido retinóico
ATP- trifosfato de adenosina
ATRA- ácido retinóico all-*trans*
Bcl-2 - *B-Cell CLL/Lymphoma 2*
BSA- albumina sérica bovina
Ca²⁺- íon cálcio
CC- células do *cumulus*
cDNA- ácido desoxirribonucléico complementar
CG- complexo de Golgi
CIM- controle imaturo
CM-Controle maturado
CCO- complexo *cumulus*-oócito
CP- corpúsculo polar
Ct- *treshold cycle*
DCFDA- diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
DCFH-2'7' -diclorofluoresceína
DMSO- dimetilsulfóxido
DNA- ácido desoxirribonucleico
EROs- espécies reativas de oxigênio
FFb- fluido folicular bovino
FIV- fertilização *in vitro*
FSH- hormônio folículo estimulante
GAGs- glicosaminoglicanas
GAPDH - *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*
GC- grânulos corticais
GMPc- monofasto cíclico de guanosina
HAS- ácido hialurônico sintases
HAS-2- *hyaluronan synthase 2*

hCG- *Human Chorionic Gonadotropin*
JNK- Jun N-terminal quinase
LCNC - nanocápsulas de núcleo lipídico
LH- hormônio luteinizante
LRAT- Lecitina: Retinol Aciltransferase
MAPK- proteína cinase ativada por mitógeno
Mcl-1- *myeloid cell leukemia-1*
MIV- maturação *in vitro*
MK- midkine
MOS-proteína proto-oncogênica *c-mos*
MPF- fator promotor da maturação
mRNA- RNA mensageiro
pb - pares de base
PBS- *phosphate buffer saline*
PCL- poli-(ϵ -caprolactona)
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PDE3-fosfodiesterase-3
PIV- produção *in vitro* de embriões
PVA- álcool polivinílico
PVP- polivinil pirrolidona
qRT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real
QVG- quebra da vesícula germinativa
RAREs- elementos responsivos ao ácido retinóico
RE- retículo endoplasmático
RNA- ácido ribonucléico
SFB- soro fetal bovino
SHC-1- *Src homology 2 domain containing*
SOF- *synthetic oviductal fluid*
TCM-199- meio de cultivo tecidual 199
TM- *melting temperature*
TTN- tretinoína livre
TTN-LCNC- nanocápsulas de núcleo lipídico associadas à tretinoína
VG- vesícula germinativa

SUMÁRIO

1	Introdução	15
2	Revisão.....	17
2.1	Maturação oocitária.....	17
2.1.1	Maturação nuclear	18
2.1.2	Maturação citoplasmática.....	19
2.2	Células do <i>cumulus</i> durante a maturação oocitária.....	22
2.3	Suplementação de meios para a maturação <i>in vitro</i>	24
3	Tretinoína	26
3.1	Suplementação com tretinoína.....	27
4	Nanotecnologia.....	28
5	Objetivo	30
5.1	Objetivo Geral	30
5.1	Objetivos específicos	30
6	Materiais e Métodos	31
6.1	Obtenção dos CCOs	31
6.2	Delineamento experimental	31
6.3	Maturação <i>in vitro</i>	32
6.4	Obtenção das nanocápsulas.....	33
6.5	Extração total de RNA e confecção de cDNA	33
6.6	PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	34
6.7	Teste de viabilidade celular e citotoxicidade.....	36
6.8	Quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	36
6.9	Análises estatísticas	37
7	Resultados.....	38
7.1	Taxa de maturação nuclear <i>in vitro</i>	38
7.2	Efeitos da suplementação sobre a viabilidade e citotoxicidade celular....	39
7.3	Efeito da suplementação na produção de EROs.....	41
7.4	Efeito da suplementação na expressão gênica.....	41
8	Discussão	46
9	Conclusão.....	49
	Referências	50

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de estudos relacionados à produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos, vêm promovendo o aumento do padrão genético e da produção animal (CAMARGO et al., 2003). No entanto, a proporção de embriões que alcançam o estágio de blastocisto é raramente superior a 40%, sendo frequente o comprometimento da qualidade e competência embrionária (LONERGAN; FAIR, 2008).

Muitos incentivos clínicos e comerciais para aumentar a eficiência da PIV são realizados durante décadas, porém o progresso vem sendo alcançado lentamente (GILCHRIST; THOMPSON, 2007). Diversos fatores intrínsecos e extrínsecos ao oócito limitam a capacidade de desenvolvimento *in vitro*.

O melhoramento dos protocolos de maturação *in vitro* (MIV) através da suplementação com diferentes hormônios, vitaminas e outras moléculas tornou-se uma necessidade para aumentar a eficiência dos meios de cultura e permitir que oócitos imaturos adquiram competência para a fertilização e embriogênese (ABE; HOSHI, 2003).

A suplementação com ácidos retinóicos (ARs) vem demonstrando efeito benéfico no processo de maturação, agindo no desenvolvimento inicial embrionário (DEB et al., 2011) e na competência oocitária (HIDALGO et al., 2003). A tretinoína (TTN, ácido retinóico all-*trans*, ATRA), metabólito ativo da vitamina A (OURIQUE et al., 2008), é considerada um dos mais importantes retinóides na embriogênese de vertebrados (MORRISS-KAY; WARD, 1999), auxiliando no estabelecimento do plano corporal durante as fases iniciais do desenvolvimento, na visão, na proliferação e diferenciação celular, na função imunológica e neuronal (TANG; GUDAS, 2011). Adicionalmente, seus receptores têm sido detectados no oócito, no estágio de

blastocisto eclodido e nas células do *cumulus* (CC) (MOHAN et al., 2001; MOHAN et al., 2002).

Embora existam inúmeras pesquisas relacionadas a função dos ARs, ainda pouco se conhece sobre a atividade da TTN na MIV dos complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) bovinos. Com a finalidade de avaliar a ação deste composto nessas condições, a utilização de nanocápsulas de núcleo lipídico associadas à tretinoína (TTN-LCNC) surge como alternativa para a suplementação do meio de cultivo. O nanoencapsulamento otimiza a eficácia de muitos agentes terapêuticos, aumentando a biodisponibilidade e a estabilidade química do composto (OURIQUE et al. 2011).

Aliado a essa nova estratégia de nanoembriologia, a utilização de marcadores moleculares vêm a acrescentar neste estudo. Os genes Mcl-1 (*myeloid cell leukemia-1*), membro anti-apoptótico da família Bcl-2 (*B-Cell CLL/Lymphoma 2*), SHC-1 (*Src homology 2 domain containing transforming protein C1*), sensível ao estresse oxidativo e HAS-2 (*hyaluronan synthase 2*) responsável pela síntese de ácido hialurônico (AH), considerados possíveis indicadores da qualidade oocitária e embrionária (ASSIDI et al., 2008; NAMEKAWA et al., 2010; BOUMELA et al., 2011;), foram selecionados para a análise dos efeitos da suplementação com TTN-LCNC nos CCOs bovinos maturados *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Maturação Oocitária

A maturação oocitária é uma parte integrante do ciclo reprodutivo que permite gerar oócitos maduros, ou seja, capazes de serem fertilizados, de sustentar o desenvolvimento pré-implantacional e completo de embriões (HANNA et al., 2012). A maturação oocitária está relacionada à ocorrência de transformações nucleares e citoplasmáticas, nas quais o oócito finaliza sua primeira divisão meiótica, progredindo do estágio de vesícula germinativa (VG) até metáfase II, redistribui as organelas e armazena RNAs mensageiros, proteínas e fatores transcricionais (FERREIRA et al., 2009).

Antes da maturação nuclear e citoplasmática, os oócitos devem completar uma fase de crescimento crítica para que possam adquirir competência para a maturação (YANG et al., 1998). Nos estágios iniciais de desenvolvimento dos folículos antrais, os oócitos da maioria dos mamíferos estão ativamente sintetizando RNA, apresentando cromatina dispersa e nucleólo não compacto (DE, V; CROZET; GALL, 1994; FAIR; HYTTEL; GREVE, 1995). No momento em que os folículos antrais atingem tamanho pré-ovulatório, a síntese é gradualmente reduzida até que o oócito entre em quiescência, alcançando a capacitação oocitária e permanecendo no estágio de diplóteno ou VG na prófase I (CRAN; MOOR, 1990; HYTTEL et al., 1997).

A completa competência oocitária é o fator chave para uma adequada maturação, pois permite a formação de uma maquinaria celular e molecular adequada para sustentar os eventos celulares seguintes. No entanto, durante a rotina laboratorial, os CCOs são retirados dos folículos antrais, interrompendo o processo natural de manutenção do bloqueio meiótico e levando a uma maturação precoce. Seguindo este propósito, pesquisadores vêm estudando a importância do

monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) neste processo. Um estudo de Zhang et al. (2010) confirmou que a interação das células da granulosa com as CC e o consequente aumento dos níveis de GMPc no oócito, são responsáveis por manter o bloqueio meiótico. A onda de hormônio luteinizante (LH), ao induzir a interrupção da transferência de GMPc ao oócito, torna ativa a enzima fosfodiesterase-3 (PDE3), responsável por hidrolisar AMPc, que em níveis reduzidos leva ao reinício da meiose. Esta cascata de sinalizações, ao mesmo tempo em que caracteriza a maturação induzida pelo LH, justifica o porquê da maturação espontânea, acionada pela remoção física dos CCOs, não ser definida como um processo fisiológico e sim como um mecanismo que ocorre na tentativa de substituir o sinal normalmente associado com a onda de LH (SIRARD, 2011).

A punção dos CCOs de folículos antrais médios, que apresentam pouco potencial para uma fecundação normal e desenvolvimento embrionário, induz a maturação nuclear espontânea que resulta na formação de uma maquinaria frágil para sustentar a embriogênese (BILODEAU-GOESELS, 2012).

2.1.1 Maturação Nuclear

A maturação ocorre após a puberdade do folículo pré-ovulatório, quando a onda de gonadotrofinas estimula o reinício da primeira divisão meiótica. Esta etapa é caracterizada pela ocorrência da maturação nuclear, na qual ocorre a condensação da cromatina e rompimento da VG. Os centríolos são duplicados e ocorre migração dos cromossomos em pares diplóides para a região equatorial, caracterizando a metáfase I. Após, o citoplasma é dividido assimetricamente formando duas células filhas de tamanhos diferentes, uma contendo maior parte do citoplasma, constituindo o oócito secundário e outra menor, expulsa para o espaço perivitelino, conhecida como corpúsculo polar (CP). Os cromossomos ainda contendo duas cromátides são novamente submetidos a meiose II, que progride até metáfase II, permanecendo o oócito secundário em repouso, caso não ocorra a fecundação. Na ovulação, se ocorrer fertilização, o oócito é estimulado a completar a meiose II, gerando duas células, que correspondem ao ócito maturo e ao segundo CP, ambos apresentando

um número haplóide de cromossomos (HYTTEL et al., 1997; GOTTARDI; MINGOTI, 2009).

A maturação nuclear é insuficiente para garantir um oócito capaz de ser fecundado e de sustentar o desenvolvimento embrionário, exigindo a ocorrência da maturação citoplasmática. Embora sejam processos interligados, a maturação nuclear, por ocorrer de forma espontânea nos oócitos bovinos, geralmente é avaliada em artigos relacionados a MIV e a fertilização *in vitro* (FIV), porém, pouco se conhece sobre os requerimentos para uma adequada maturação citoplasmática (FERREIRA et al., 2009).

2.1.2 Maturação Citoplasmática

A maturação citoplasmática pode ser considerada como um processo em que o oócito sofre alterações estruturais e biológicas que o torna apto para ativação, formação do pronúcleo e desenvolvimento pré-implantacional (IZADYAR et al., 1998). Essas modificações podem ser resumidas em três eventos principais que são: a redistribuição das organelas citoplasmáticas, a dinâmica dos filamentos no citoesqueleto e a maturação molecular (FERREIRA et al., 2009).

a) Redistribuição de organelas

As alterações estruturais e biológicas de organelas como mitocôndrias, ribossomos, complexo de Golgi (CG), grânulos corticais (GC) e retículo endoplasmático (RE), são consideradas indispensáveis, tanto para o oócito quanto para os estágios embrionários iniciais. As mitocôndrias, responsáveis pelo fornecimento da energia consumida durante o processo de maturação, produzem o trifosfato de adenosina (ATP) necessário para a síntese de proteínas, proporcionando a continuidade do processo de maturação e desenvolvimento embrionário (KRISHER; BAVISTER, 1998; STOJKOVIC et al., 2001). Além disso, o número destas organelas e a localização em áreas de alto consumo de energia são considerados fatores essenciais para o oócito durante etapas cruciais do ciclo celular (FERREIRA et al., 2009).

Em relação aos ribossomos, é visto que a síntese de proteínas realizadas na metáfase I é aproximadamente três vezes maior do que ocorre durante o processo

de quebra da vesícula germinativa (QVG), sugerindo que ocorra a estocagem dessas organelas para que sejam utilizadas durante o estágio de metáfase II, sintetizando proteínas em períodos considerados decisivos para o desenvolvimento (TOMEK; TORNER; KANITZ, 2002).

A participação do CG durante a maturação e fertilização em mamíferos ainda necessita de maiores estudos. A presença de fragmentos do CG nos oócitos, quando em estágio de VG, e a produção dos GC, são funções conhecidas desta organela (PAYNE; SCHATTEN, 2003).

A exocitose de GC é um mecanismo utilizado para evitar a polispermia (HOSOE; SHIOYA, 1997). Estas organelas exclusivamente encontradas nos oócitos são constituídas por proteínas, moléculas estruturais, enzimas e glicosaminoglicanas (GAGs), que permitem através da sua migração a avaliação da maturação citoplasmática em oócitos de mamíferos (BÉZARD, 1997). A liberação dos GC é controlada pelo RE e está vinculada a proteínas dependentes de cálcio e aos níveis de cálcio intracelular (ABBOTT; DUCIBELLA, 2001). O RE é responsável pela regulação da homeostase do cálcio celular, apresentando extrema importância durante a maturação, por desencadear mecanismos complexos de sinalização em eventos de desenvolvimento (MACHACA, 2007).

b) Dinâmica de filamentos do citoesqueleto

O movimento de organelas citoplasmáticas e a separação dos cromossomos durante a meiose e mitose são responsáveis pela capacitação do oócito, permitindo a aquisição da competência nuclear (ALBARRACIN et al., 2005).

O citoesqueleto é composto por três tipos de filamentos, que são formados por subunidades características que os diferenciam. Os microtúbulos consistem em subunidades compactas e globulares de tubulinas, enquanto que os filamentos de actina por subunidades de actina, similarmente arranjadas. Os filamentos intermediários consistem em subunidades polipeptídicas fibrosas e longas organizadas em tetrâmeros, formando uma rede que interliga as membranas celulares, as organelas citoplasmáticas e o núcleo (MACHADO; FIGUEIREDO, 1996; FERREIRA et al., 2009).

Estes filamentos são mantidos por ligações não-covalentes, garantindo a resistência celular em resposta ao estresse, a modulação da expressão gênica e a

produção de proteínas em células transcricionalmente inativas, como oócitos e embriões nos estágio inicial de desenvolvimento (GANDOLFI; BREVINI, 2010).

c) Maturação Molecular

A maturação molecular consiste na transcrição, armazenamento e processamento dos mRNAs expressos pelos cromossomos (FERREIRA et al., 2009).

A ativação transcricional envolve a fosforilação de diversos fatores, tais como a proteína S6 da subunidade ribossomal 40S e a desfosforilação da poliA polimerase (COLGAN et al., 1996; GAVIN; SCHORDERET-SLATKINE, 1997; FAN; SUN, 2004). Nos oócitos, a regulação da transcrição é baseada nas mudanças de tamanho da cauda poliA do mRNA, pois, é visto que caudas curtas presentes em oócitos transcricionalmente inativos, quando alongadas durante etapas específicas do desenvolvimento embrionário, os tornam ativos (GANDOLFI; BREVINI, 2010).

Os principais transcritos produzidos durante a maturação molecular do CCO codificam para reguladores do ciclo celular como o fator promotor da maturação (MPF), a proteína proto-oncogênica *c-mos* (MOS) e a proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) (FERREIRA et al., 2009). O MPF é o principal regulador de modificações morfológicas durante a maturação, ativado pela queda nas concentrações de AMPc causada pelo pico de LH. A proteína MOS ativa a MAPK que controla os níveis de MPF, possibilitando a transição da fase do ciclo celular G2 para a mitose (GANDOLFI; GANDOLFI, 2001). A síntese e o armazenamento apropriado desses transcritos no citoplasma do oócito pode ser crucial para a continuidade da maturação nuclear e progressão da meiose (FERREIRA et al., 2009)

Outros transcritos codificados durante a maturação do CCO também participam da coordenação de eventos celulares. Os RNAs mensageiros que codificam para os receptores do hormônio folículo estimulante (FSH), LH e conexina 43 podem ser preditores da competência oocitária *in vitro*, devido a realização de funções como a sinalização celular e foliculogênese (ALI; BILODEAU; SIRARD, 2003; CALDER et al., 2005).

Adicionalmente, outras moléculas importantes para o desenvolvimento e progressão da maturação e desenvolvimento embrionários são sintetizadas e

acumuladas dentro do oócito, passando a serem consideradas marcadores da maturação citoplasmática. A enzima glutatona, juntamente a outras moléculas antioxidantes, é responsável pela proteção celular contra danos oxidativos causados pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o metabolismo mitocondrial, e moléculas de ATP parecem estar em quantidades maiores em oócitos morfológicamente competentes (ALI; BILODEAU; SIRARD, 2003; TARAZONA et al., 2006).

2.2 Células do *cumulus* durante a maturação oocitária

Nos folículos primários, que contém os oócitos em crescimento, são formadas duas populações de células da granulosa distintas, as células da granulosa parietal e as CC (CORTVRINDT; SMITZ, 2001)

As CC consistem em um grupo intimamente associado de células da granulosa que circundam o oócito, que participam do crescimento e da maturação oocitária (VAN et al., 2002). As CC e as células da granulosa parietal, juntamente com o oócito, formam um sincício mediado por junções comunicantes, que são de vital importância para o crescimento do oócito (VAN et al., 2011). A presença destas junções, mais especificamente junções gap, junto à capacidade de metabolização dos CCOs, são responsáveis pela manutenção do bloqueio meiótico, pelo recomeço da meiose e auxílio na maturação citoplasmática (TANGHE et al., 2002).

As junções gap, formadas pelas conexinas, permitem a transferência de íons e pequenas moléculas entre as células, tais como, inibidores meióticos como as purinas (hipoxantina e adenosina) e AMPc (EPPIG; WARD-BAILEY; COLEMAN, 1985; DOWNS; EPPIG, 1986). Bilodeau, Fortier, Sirard (1993) mostraram que o aumento dos níveis intracelulares de AMPc e o bloqueio do reinício da meiose não ocorre em oócitos cultivados sem as CC, demonstrando a necessidade da existência de uma comunicação entre os oócitos e as CC durante o cultivo, para promover o crescimento oocitário e o desenvolvimento *in vitro*.

Em relação ao recomeço da meiose, Mattiolo e Barboni (2000) propuseram que as células somáticas recebem o sinal do LH e enviam um segundo mensageiro ao oócito por dois mecanismos diferentes. O LH pode agir indiretamente na parede

folicular induzindo células da teca e/ou granulosa a secretarem um segundo mensageiro no fluído folicular, ou diretamente, através das junções gap.

As CC reagem ao sinal do LH com um aumento de Ca^{2+} intracelular, que juntamente ao AMPc é considerado um sinal candidato para o recomeço da meiose. A entrada de Ca^{2+} nessas células vai alterar também o potencial de membrana do oócito, devido a ligação elétrica entre essas duas células, resultando em um segundo aumento desse íon intracelularmente (MATTIOLI; BARBONI, 2000). A ligação entre *cumulus* e oócito sofre mudanças conformacionais durante a maturação causando perda das junções gap, que provavelmente são responsáveis pelo recomeço da meiose por impossibilitar a condução de sinais inibitórios da meiose das CC para o oócito (WERT; LARSEN, 1989).

Outros eventos iniciados pela onda de LH também são necessários para que ocorra a ovulação e a maturação do oócito. A expansão das CC, devido a deposição de AH nos espaços intercelulares e a produção de proteínas de interação com a matriz extracelular, fazem parte de uma série de eventos celulares importantes (MAREI; GHAFARI; FOULADI-NASHTA, 2012).

O AH pertence a família das GAGs, é sintetizado por enzimas ácido hialurônico sintases (HAS), destacando-se a enzima HAS-2. No folículo pré-ovulatório, interage com receptores de superfície, principalmente CD44, sendo responsável pela formação de uma matriz extracelular altamente hidratada e viscosa, resultando em um aumento de 20 a 40 vezes no volume completo do CCO (STERN; ASARI; SUGAHARA, 2006).

O CCO expandido, através da rede tridimensional formada pelo AH interage com outras macromoléculas da matriz extracelular responsáveis pela expansão e mucificação das CC (IRVING-RODGERS; RODGERS, 2005). A condição mucosa do CCO é frequentemente correlacionada com a ocorrência da maturação do oócito (TESTART, 1985).

Em estudo recente realizado por Marei, Ghafari, Fouladi (2012), foi demonstrado que a inibição da síntese de AH por suplementação com 4-metilumbeliferona (4-MU), significativamente impediu a expansão das CC, diminuindo as taxas de maturação nuclear e o subsequente desenvolvimento embrionário, não havendo produção de blastocistos após a FIV.

Adicionalmente às contribuições das CC no processo de maturação nuclear, elas também previnem alterações nos oócitos que prejudicam a fertilização e facilitam sua captura pela fímbria do oviduto (TIRONE et al., 1997).

Em relação à maturação citoplasmática, as CC são responsáveis pela síntese de fatores solúveis, que induzem ao desenvolvimento da competência, e pela remoção de componentes supressores do desenvolvimento embrionário presentes no meio (CHIAN; NIWA; SIRARD, 1994).

As células da granulosa reduzem cistina a cisteína e promovem a captação de cisteína em oócitos bovinos durante a maturação, elevando o conteúdo intracelular de glutathione (TAKAHASHI; FIRST, 1992). Os níveis elevados de glutathione melhoram a disponibilidade de energia, resultando em maiores taxas de fertilização e de formação de blastocistos (TANGHE et al., 2002).

A glicose também é metabolizada pelas CC, produzindo piruvato, que é fornecido ao oócito, aumentando a disponibilidade energética e melhorando sua qualidade. Oócitos cultivados sem as CC possuem uma maior dificuldade em metabolizar glicose em comparação aos oócitos cultivados com as CC (TANGHE et al., 2002).

2.3 Suplementação de meios para maturação *in vitro*

Os meios de cultivo utilizados para a MIV, por serem formulações complexas originalmente produzidas para sustentar as necessidades metabólicas de células somáticas e tecidos, ainda não fornecem as condições necessárias para se atingir os níveis de eficácia obtidos no processo *in vivo* (MINGOTI et al., 2009).

Atualmente, o meio mais comumente usado no procedimento *in vitro* é o meio de cultivo tecidual 199 (TCM-199) (FUKUI, 1989), porém, alguns grupos de pesquisa utilizam o *synthetic oviductal fluid* (SOF) destinado para o cultivo de embriões (ALI; SIRARD, 2002). Lonergan et al. (2003) confirmou que o meio SOF é capaz de promover a MIV sem a presença de macromoléculas, porém, a qualidade dos embriões gerados é inferior aos originados de oócitos cultivados em TCM-199 (LONERGAN et al., 2003; RUSSELL et al., 2006). Estes meios servem como base para a suplementação com fontes protéicas como soro fetal bovino (SFB) e albumina sérica bovina (BSA), gonadotropinas (LH, FSH e hCG- *Human Chorionic*

Gonadotropin), fatores de crescimento (IGF, TGF, EGF e FGF), progesterona, líquido folicular e antioxidantes (MINGOTI et al., 2009; BUKOWSKA et al., 2012).

As macromoléculas BSA e SFB são partículas coloidais, que facilitam o transporte fluídico através das membranas biológicas e aumentam a maturação e o desenvolvimento embrionário. Elas agem como quelantes de íons, estabilizantes de pH, surfactantes e sequestradores de EROs (STEIN, 2007). Entretanto, por serem de origem animal, as composições não são completamente conhecidas, e o risco de transmissão de patógenos e a variação entre produtores e lotes contribuem para existência da variabilidade nos sistemas de cultivo e nos resultados obtidos (MINGOTI et al., 2009). Como alternativa para a padronização da técnica de MIV, aditivos sintéticos, como o álcool polivinílico (PVA) e a polivinil pirrolidona (PVP), estão sendo empregados em substituição aos convencionalmente utilizados, porém muitos estudos indicam a produção de menores taxas de blastocistos viáveis (SORIA, 2005).

Em relação as gonadotropinas, investigações sobre a MIV do CCO indicam a melhora na maturação oocitária (DE et al., 1999; CHIAN et al., 2002). O efeito é resultado de suas ações fisiológicas na comunicação oócito-CC e na maturação citoplasmática de CCOs *in vitro* (CHA; CHIAN, 1998). Já os hormônios de crescimento aceleram a maturação nuclear e aumentam a expansão das CC, a taxa de blastocistos e embriões devido à melhor distribuição dos GC (IZADYAR et al., 1998).

A progesterona possui participação na capacitação oocitária. Em primatas, a suplementação durante a MIV aumentou a competência dos oócitos (ZHENG et al., 2003), indicando a ação direta nos oócitos ou nas CC circundantes (LARSON; KRISHER; LAMB, 2011).

O fluido folicular bovino (FFb) também demonstra atuação no processo de crescimento oocitário. A suplementação com 5% (v/v) de FFb reforçou a translocação mitocondrial, níveis intracelulares de ATP e a expansão das CC. Além disso, foi visto uma maior proteção ao estresse oxidativo gerado pela possível presença de melatonina, que junto a outras moléculas antioxidantes, como mercaptoetanol, cisteína, vitaminas A, C e E ou cátions quelantes divalentes como o EDTA, taurina, hipotaurina e transferrina, surge como uma alternativa de suplementação em vários estudos (SOMFAI et al., 2012). A capacidade de

preservação da viabilidade celular durante a manipulação *in vitro*, protegendo a célula do mecanismo de estresse oxidativo, torna essas moléculas valorizadas funcionalmente (EL-RAEY et al., 2011).

Adicionalmente à essas suplementações com compostos e moléculas para suprir as necessidades nutricionais e fisiológicas dos oócitos, a utilização de substâncias que retêm o processo de meiose como a roscovitina e butirolactona-I, o controle das condições de pH, temperatura, osmolaridade do meio e tensão de O₂, também interferem no sucesso da MIV (GILCHRIST; THOMPSON, 2007).

3 Tretinoína

A tretinoína (TTN, ácido retinóico all-trans, ATRA), um retinóide natural, também chamada de ácido retinóico all-*trans*, é metabólito ativo da vitamina A (OURIQUE, et al., 2008) e pertence a primeira geração de retinóides juntamente com a isotretinoína que é seu isômero *cis* (RIGOPOULOS et al., 2004). Considerada um dos mais importantes retinóides na embriogênese de vertebrados (MORRIS; WARD, 1999), desempenha sua função através da interação ligante-receptor, auxiliando no estabelecimento do plano corporal durante as fases iniciais no desenvolvimento, na visão, na proliferação e diferenciação celular, na função imunológica e neuronal (TANG; GUDAS, 2011). Os isômeros AR all-*trans* e 9-*cis* se ligam à receptores AR (RAR; α , β e γ) e AR X (RXR; α , β e γ) respectivamente, porém, sob condições *in vitro*, AR 9-*cis* pode ativar ambos, RXR e RAR. Quando ativados, os receptores nucleares RAR-RXR formam heterodímeros, que são capazes de se ligarem à sequências de DNA específicas, chamadas de elementos responsivos ao ácido retinóico (RAREs), as quais estão presentes nas regiões promotoras de seus genes alvos, aumentando ou diminuindo a expressão gênica. Além disso, os RXRs podem formar homodímeros e outros heterodímeros com o receptor da vitamina D, do hormônio tireodiano e com o receptor ativado por proliferador peroxissomal (CHAMBON, 1996), assim podendo explicar os efeitos pleiotrópicos dos retinóides.

As concentrações intracelulares de retinóides são controladas por diversas enzimas metabólicas, que podem ter seus níveis alterados por moléculas de sinalizações externas (TANG; GUDAS, 2011). Vários tipos de câncer humano,

incluindo o de cavidade oral, pele, rim, bexiga, próstata e mama, apresentam baixos níveis intracelulares de ésteres de retinil e diminuição da expressão de LRAT (Lecitina: Retinol Aciltransferase). LRAT é uma enzima que catalisa a esterificação de retinol a éster de retinil, aumentando a captação de retinol pela célula (MONGAN; GUDAS, 2007).

Muito utilizada também para tratamentos de doenças de pele como acne vulgar e psoríase, e no tratamento anti-tumoral, pesquisadores vêm buscando associar TTN a nanopartículas poliméricas para melhorar a sua solubilidade, estabilidade química, biodisponibilidade e/ ou eficácia (BRISAERT et al., 2001). Logo, há intensos estudos relacionados a esta molécula e outros AR, porém há necessidade de se esclarecer os efeitos desta molécula nanoencapsulada como suplemento no processo de PIV de embriões.

3.1 Suplementação com tretinoína

O surgimento de evidências apontando para o papel da vitamina A e de seus metabólitos no crescimento celular, na diferenciação e desenvolvimento embrionário, tanto sob as condições *in vivo* como *in vitro*, fez crescer o interesse de pesquisas utilizando esses componentes como aditivos no processo de MIV de oócitos (ALMINANA et al., 2008).

Schweigert e Zucker (1988) demonstraram que as concentrações de vitamina A no FFb são significativamente influenciadas pela qualidade folicular, observando altas concentrações em folículos não atrésicos, e baixas em folículos atrésicos. Alternativamente, ARs podem melhorar a qualidade e o processamento de mRNA durante a maturação através do aumento da poliadenilação (GOMEZ et al., 2004), e agir na expressão dos receptores de FSH e LH, como demonstrado nas células da granulosa de murinos (MINEGISHI et al., 2000) e suínos (HATTORI et al., 2000).

Os retinóides também exercem proteção contra os danos oxidativos, mantendo os níveis adequados de compostos e enzimas antioxidantes (GUERIN; EL; MENEZO, 2001); induzem maior expressão de midkine (MK), fator de crescimento ligante de heparina, que parece aumentar a capacidade de desenvolvimento de embriões e oócitos (IKEDA et al., 2000). Além disso, subtipos

RAR α , RAR γ , RXR α , RXR β têm sido detectados no oócito, no estágio de blastocisto eclodido e nas CC (MOHAN et al., 2001; MOHAN et al., 2002), sugerindo que os ARs podem estimular desenvolvimento inicial embrionário (DEB, 2011) e a competência oocitária (HIDALGO, 2003).

Duque e colaboradores (2002) demonstraram que a suplementação com AR 9-*cis*, na presença de roscovitina, melhorou a maturação citoplasmática; Barekati e colaboradores (2008) observaram o aumento das taxas de maturação e competência em oócitos imaturos desnudos de camundongos.

Estes estudos (SCHWEIGERT; ZUCKER, 1988; MOHAN et al., 2001; MOHAN et al., 2002; GOMEZ et al., 2004) mostram o efeito benéfico que os ARs exercem sobre a MIV. No entanto, são escassos os dados sobre a ação da TTN nas CC e no oócito bovino, o qual é amplamente utilizado em estudos que servem como base para o entendimento das necessidades e do comportamento deste gameta em outras espécies, como a humana. A fim de alcançar melhores resultados no processo *in vitro*, a utilização de TTN-LCNC na suplementação de meios durante as rotinas laboratoriais, surge como uma importante ferramenta biotecnológica para a reprodução animal.

4. Nanotecnologia

Devido aos recentes avanços na ciência dos materiais e nano-engenharia, as nanopartículas têm se tornado muito atraentes para as aplicações nas áreas de biologia e medicina (MAHAPATRO; SINGH, 2011). Uma vez que a maioria das macromoléculas biologicamente ativas e agentes, tais como vírus, membranas e os complexos proteicos são nanoestruturas naturais, supõe-se que as nano-estruturas são capazes de interagir melhor com a membrana celular e as proteínas (MOHANRAJ; CHEM, 2006).

As nanopartículas poliméricas têm sido extensivamente estudadas como carreadores de drogas, proporcionando que um agente terapêutico de interesse possa ser incorporado ou encapsulado dentro de sua matriz polimérica, adsorvido ou conjugado sobre a sua superfície (LABHASETWAR; SONG; LEVY, 1997). Elas são utilizadas para modificar a liberação e o perfil de distribuição de compostos ativos, permitindo uma entrega local ou sítio-específica mais eficaz da molécula e a redução

dos seus efeitos tóxicos (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Além disso, as nanopartículas poliméricas melhoram a entrega intracelularmente de drogas e os seus efeitos terapêuticos através do aumento da estabilidade e da liberação controlada de medicamentos, especialmente dos que atuam através de receptores citoplasmáticos (ALMOUAZEN et al., 2012).

Muito utilizada para tratamentos de doenças de pele e no tratamento anti-tumoral, pesquisadores vêm buscando associar TTN a nanopartículas poliméricas para melhorar a sua solubilidade, estabilidade química, biodisponibilidade e/ ou eficácia. Darmanin et al. (2007) sugeriram que o AR pode melhorar a migração de células dendríticas do tumor para os gânglios linfáticos de drenagem, aumentando a imunidade anti-tumoral, porém a solubilidade em água e a estabilidade baixas do AR são as principais desvantagens das suas formulações. O uso clínico de AR foi associada com uma rápida diminuição da sua concentração no soro após a contínua administração oral ou injeção intravenosa (ACHKAR et al., 1994). No entanto, a nanoencapsulação de AR pode ultrapassar estas limitações e, portanto, oferece maiores vantagens. Ourique et al. (2008) mostraram que a utilização de nanocápsulas reforça duas vezes mais a fotoestabilidade do AR em relação a solução metanólica.

O nanoencapsulamento de AR demonstra um perfil de liberação prolongada e uma maior estabilidade (ALMOUAZEN et al., 2012), oferecendo uma nova estratégia no tratamento anti-tumoral e de doenças de pele, e para os estudos relacionados ao desenvolvimento embrionário, possibilitando o surgimento da nanoembriologia.

5 OBJETIVO

5.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos da suplementação com tretinoína associada a nanocápsulas de núcleo lipídico na maturação *in vitro* de CCOs bovinos.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão dos genes HAS-2, Mcl-1 e SHC-1 nos CCOs bovinos maturados *in vitro*;
- Testar as concentrações de 0,25, 0,5 e 1 μM de tretinoína livre (TTN) e TTN-LCNC suplementadas no meio de MIV;
- Testar as concentrações de 0,25, 0,5 e 1 μM da suspensão de nanocápsulas (LCNC), para averiguar se há interferência de sua ação na função do composto;
- Verificar a formação de EROs após a MIV em oócitos bovinos;
- Avaliar a toxicidade e a viabilidade de oócitos imaturos e maturados *in vitro*;
- Elaboração de protocolo para teste de novos fármacos;

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Obtenção dos CCOs

Os ovários utilizados para a obtenção dos CCOs foram coletados de fêmeas bovinas abatidas em frigorífico localizado na cidade de Pelotas/RS. O tempo decorrente entre o abate e a coleta foi de aproximadamente 1 hora, e os ovários foram transportados em recipiente térmico até o laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese Animal, localizado no Centro de Desenvolvimento Tecnológico da UFPel.

Os CCOs foram aspirados dos folículos com tamanhos entre 2 a 8 mm de diâmetro (LEHMKUHL et al., 2002), através da utilização de uma agulha 14 G acoplada a uma seringa descartável, e colocados em tubos cônicos de 50 mL. O líquido folicular foi filtrado e lavado com PBS (*phosphate buffer saline*) em filtro coletor de embriões (Nutricell, Campinas-SP), e o depósito celular formado foi colocado em placa de petri para procura dos CCOs em lupa estereomicroscópica.

A seleção dos CCOs foi realizada de acordo com as características morfológicas (DE et al., 1989), avaliando o número de camadas e grau de compactação das CC, homogeneidade do citoplasma e integridade da zona pelúcida, selecionando apenas os oócitos considerados viáveis e transferindo-os para o meio de lavagem.

6.2 Delineamento experimental

Foram estabelecidos 10 grupos experimentais, de acordo com a suplementação do meio de MIV, com diferentes concentrações de TTN e TTN-LCNC, além dos grupos controles (maturado somente na presença de nanocápsulas - (LCNC); meio de MIV sem suplementação - CM (Fig. 1A); e imaturo - CIM (Fig.

1B)). Cada grupo experimental foi composto de \pm 60 CCO. Para os grupos TTN-LCNC e TTN, foram utilizadas as concentrações de 0,25, 0,5 e 1 μ M. Da mesma forma, foi realizado o grupo controle com as mesmas concentrações da suspensão de LCNC.

As suspensões de LCNC e TTN-LCNC foram preparadas rotineiramente, já para a solução de TTN foi preparada uma solução estoque a 50 μ M utilizando-se dimetilsulfóxido (DMSO) como diluente. A partir destas soluções, foram calculados os volumes necessários de meio e de formulação para definição das concentrações finais.

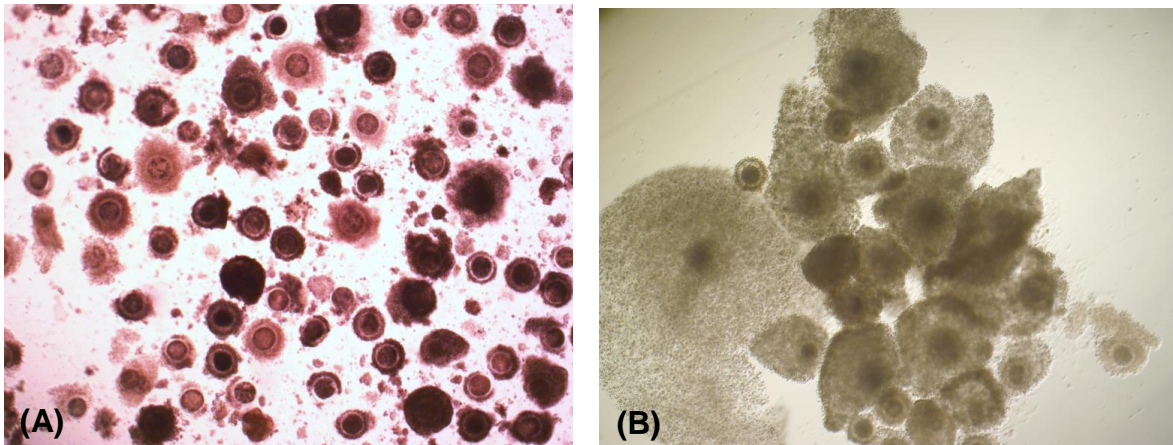


Figura 1 – (A) Complexos *cumulus*-óóitos imaturos prévio a sele o e lavagem para a maturac o *in vitro*; (B) Complexos *cumulus*-  óitos maturados *in vitro*.

6.3 Obten o das nanocápsulas

As suspensões de LCNC e TTN-LCNC foram sintetizadas pelo Prof^o Ruy Beck e sua equipe da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e gentilmente cedidas ao estudo. Para a prepara o das nanocápsulas, foi utilizado o método de deposi o interfacial de polímero pré-formado (JAGER et al., 2009), utilizando poli-( -caprolactona) (PCL) como matriz polimérica e monoestearato de sorbitano no núcleo das nanocápsulas, disperso no triglicerídeo dos ácidos c prico e caprílico (OURIQUE et al., 2008).

6.4 Maturação *in vitro*

Os CCOs selecionados para MIV foram lavados duas vezes em meio de lavagem, e cada *pool* contendo 25 CCOs, referente a uma determinada concentração dos tratamentos, foi lavado em uma gota contendo o meio de MIV TCM-199 suplementado com 10% de SFB, 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin-V, Bioniche, Beleville, Canadá) e 5 µg/mL de LH (Lutropin-V, Bioniche, Beleville, Canadá) e a sua concentração de tratamento correspondente. Após, foram transferidos para gotas de 100 µL cobertas com óleo mineral preparadas anteriormente, seguindo o delineamento experimental.

As placas contendo os CCOs foram submetidas a MIV em estufas de cultivo (Heal Force- HF-160 W) a 5% de CO₂ e 38,5°C, onde permaneceram durante 22 a 24 horas (Fig. 1B). Após este período os CCOs tiveram suas CC retiradas por pipetagem em solução de 80UI de hialuronidase Tipo I-S (Sigma®- Aldrich, Alemanha). Os CCOs foram armazenados, CC e oócitos, separadamente em reagente *TRIZOL*® (Invitrogen, EUA) a -70 °C.

6.5 Extração total de RNA e confecção de cDNA

Após o período de MIV, foi realizada a extração de RNA das amostras de CCOs para avaliação da expressão dos genes Mcl-1, SHC-1, HAS-2 por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). A extração do RNA total das amostras foi realizada utilizando o Reagente de *TRIZOL*® (Invitrogen, EUA) segundo protocolo proposto por Kang et al. (2009), com modificações.

O RNA extraído dos *pools* de oócitos e dos grupos de células foi quantificado através de espectrofotometria (Nanovue, GE Healthcare Life Sciences), e padronizado a fim de obter a mesma concentração de cDNA (50 ng/µL) em todos os grupos e concentrações.

As amostras de RNA foram submetido à reação de transcriptase reversa para obtenção de cDNA (ácido desoxirribonucléico complementar) seguindo as instruções do manual do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription*® (Applied Biosystems, USA). Ao término dessa etapa foram obtidos 20 µL de cDNA que foi então utilizado como *template* na reação de qRT-PCR.

6.6 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

A qRT-PCR foi realizada utilizando o termociclador MX300 (Stratagene) e protocolo de detecção baseado na amplificação com SYBR® Green (Applied Biosystems, EUA).

Os *primers* para HAS-2 e SHC-1 foram selecionados segundo Assidi et al. (2008) e Namekawa et al. (2010) respectivamente; e para Mcl-1, as sequências foram construídas através do programa Vector NTI advance 11 (Invitrogen, Brasil) (Tab. 1). Testes para avaliar a eficiência dos *primers* foram realizados utilizando-se o cDNA padronizado em diluição seriada. A reação foi otimizada seguindo os seguintes parâmetros: 94° C por 10 min, seguidos de 45 ciclos de 94° C por 10 seg, 6° C por 35 seg e 72° C por 2 min, extensão final de 72°C por 5 min, seguida de curva de dissociação. Para a quantificação relativa da reação utilizou-se o gene endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (OPIELA et al., 2008) como normalizador da reação.

Os dados da expressão gênica foram comparados através do método Delta Delta CT ($\Delta\Delta Ct$), calculados a partir dos valores de Ct (*threshold cycle*) obtidos na reação de qRT-PCR (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002).

Tabela 1 – Sequências dos primers utilizados para qRT-PCR

Gene	Número acesso	Sequência	Tm* (°c)	Fragmento (pb)	Eficiência (%)	Correlação (r ²)
Mcl-1	NM_001099206.1	F 5' TGTGGCCAAACACTTGAAGAGT 3' R 5' CCTTACGAGAACATCTGTGATGCTT 3'	60	82	84,3	0.943
SHC-1	NM_001075305.1	F 5' AAGTCAACGGGGACTTCCTT 3' R 5' GGCAAGTGATTGTCCATGTG 3'	60	187	91,8	0.773
HAS-2	NM_174079.2	F 5' ATAAATGTGGCAGGCGGAAGAAGG 3' R 5' GTCTTTGTTCAAGTCCCAGCAGCA 3'	60	134	98.0	0.964
[GAPDH	NM_001163856.1	F 5' GCC GTA ACT TCT GTG CTG TG 3' R 5' AAT GAA GGG GTC ATT GAT GG 3'	60	150	84.0	0.98

*TM: temperatura de *melting*

6.7 Teste de viabilidade celular e citotoxicidade

O oócitos desnudos após a MIV tiveram sua viabilidade avaliada com o kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity (Live/Dead– Viability/Cytotoxicity Kit – Molecular Probes Inc.), conforme as recomendações do fabricante. O kit possui dois compostos fluorescentes, a acetometoxi-calceína e o homodímero de etídio-1, que marcam células viáveis e inviáveis, baseando-se na integridade de membrana e na atividade de esterase. A acetometoxi-calceína ao penetrar nas células viáveis é clivada por esterases intracelulares liberando a calceína (ex/em ~495 nm/~515 nm) e emitindo fluorescência na cor verde. Já o heterodímero de etídio-1 (ex/em ~495 nm/~635 nm) penetra em células com danos de membrana e se intercala no DNA destas células, emitindo fluorescência na cor vermelha (MERDASSI et al., 2011).

6.8 Quantificação de espécies reativas de oxigênio

A formação EROs foi avaliada nos oócitos desnudados após a MIV segundo Morado et al. (2009). Os oócitos foram incubados em gotas de PBS contendo diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA) (*Sigma-Aldrich*®) durante 30 min. O DCFDA penetra nas células sendo hidrolisado por esterases e transformado no composto não fluorescente 2'7' -diclorofluoresceína (DCFH), impermeável à membrana celular. Este, em presença de EROs é rapidamente oxidado e transformado em diclorofluoresceína (DCF) que emite fluorescência quando excitado em 503 nanômetros (HASHIMOTO et al., 2000).

Depois de transcorrido o tempo determinado, as emissões fluorescentes dos oócitos foram registradas utilizando uma câmara digital ligada a um microscópio invertido de fluorescência (Olympus IX 51, Japão). A intensidade emitida foi quantificada através do software Cell[^]F (Olympus), o qual gerou intensidade de fluorescência, em pixels.

6.9 Análises estatísticas

Os resultados dos métodos de fluorescência foram analisados por Two-way ANOVA, sendo utilizado para o teste de viabilidade e citotoxicidade celular o teste qui-quadrado, considerando significantes valores de $P \leq 0,05$.

7 RESULTADOS

7.1 Taxa de maturação nuclear *in vitro*

A avaliação da maturação nuclear utilizada na rotina *in vitro* foi dada através da observação da extrusão do primeiro corpúsculo polar, que indica que a metáfase II foi atingida. A tab. 2 apresenta os dados referentes às taxas de maturação nuclear alcançadas *in vitro*.

Tabela 2 – Taxa de maturação nuclear *in vitro*

Grupos experimentais	Total de oócitos	% Maturados	% Imaturos	% Degenerados
LCNC* 0,25	61	62,30 ^a	29,51	8,20
LCNC 0,5	68	57,35 ^a	33,82	8,82
LCNC 1	55	63,64 ^a	25,45	10,91
TTN-LCNC* 0,25	70	67,14 ^a	27,14	5,71
TTN-LCNC 0,5	66	60,61 ^a	31,82	7,58
TTN-LCNC 1	70	48,57 ^a	41,43	10,00
TTN* 0,25	58	60,34 ^a	32,76	6,90
TTN 0,5	79	58,23 ^a	30,38	11,39
TTN 1	60	51,67 ^a	41,67	6,67
CM	92	65,22 ^a	27,17	7,61

*LCNC: nanocápsulas; TTN-LCNC: tretinoína associada a nanocápsulas; TTN: tretinoína livre; CM: controle maturado. A letra a minúscula indica que não houve diferenças na taxa de maturação entre os grupos, P<0,05.

7.2 Efeitos da suplementação sobre a viabilidade e toxicidade celular

Conforme observado entre o grupo CMI e os demais grupos que sofreram o processo de MIV, a manipulação *in vitro* provoca danos e perda da viabilidade de membrana nos oócitos (Fig. 2 e 3), ressaltando a importância de suplementos que protejam os CCOs. No entanto, não foi observado diferença entre os grupos suplementados com TTN e o grupo CM neste teste de viabilidade e toxicidade celular (Fig.3). Os oócitos submetidos à maturação *in vitro* (Fig. 3A) demonstram emissão de fluorescência vermelha, indicando morte celular, já os oócitos do grupo CIM, emitem fluorescência verde, indicando ausência de dano de membrana. (Fig. 3B).

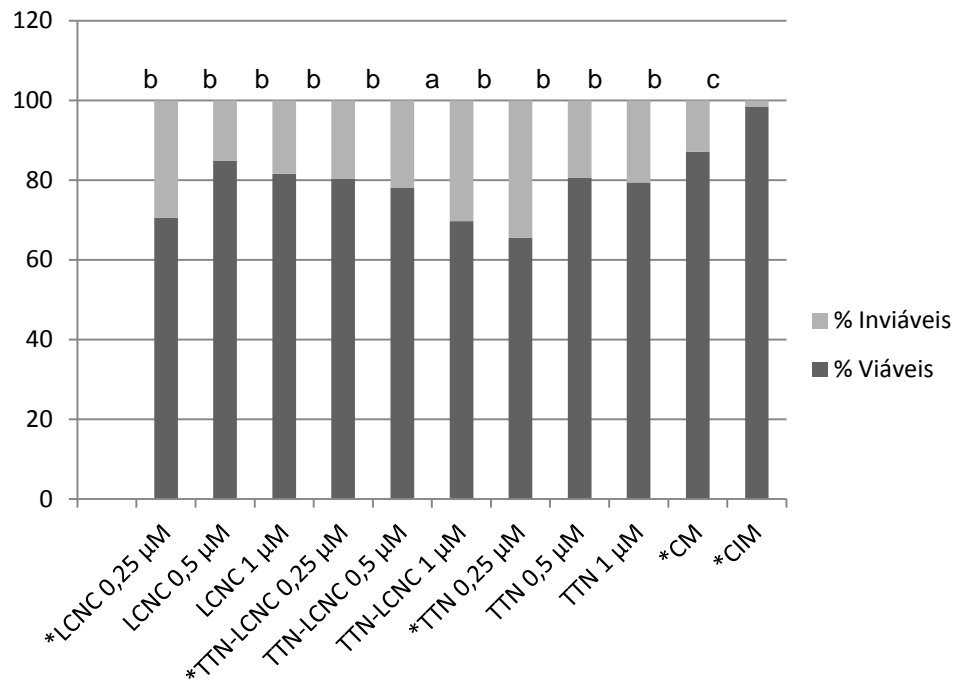


Figura 2 – Efeitos da suplementação com TTN-LCNC na viabilidade e toxicidade celular de oócitos bovinos. Oócitos imaturos e oócitos submetidos a MIV foram utilizados para a avaliação da integridade de membrana celular. *LCNC = suspensão contendo somente nanocápsulas; *TTN-LCNC = tretinoína associada a nanocápsulas de núcleo lipídico; *TTN = tretinoína. Letras diferentes demonstram diferenças significativas entre os tratamentos, $P < 0,05$.

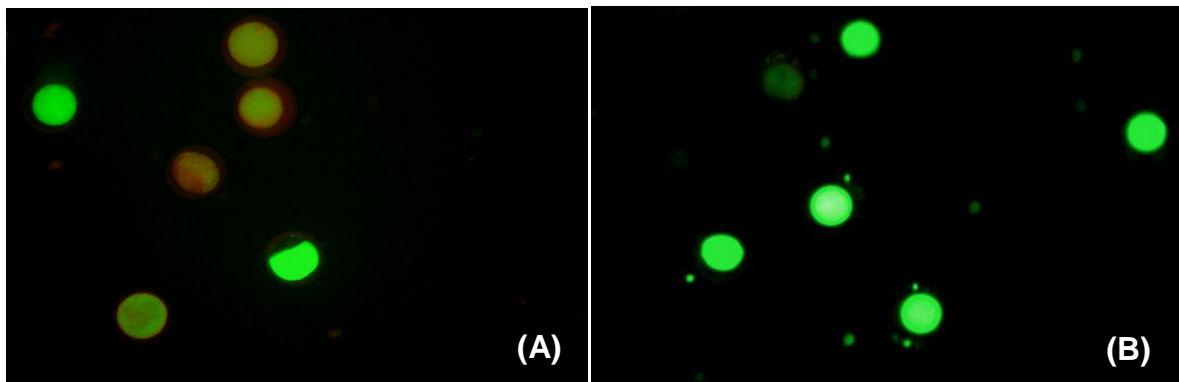


Figura 3 – Avaliação da viabilidade de membrana e citotoxicidade em oócitos. (A) Oócitos submetidos a maturação *in vitro*; (B) Oócitos do grupo controle imaturo. Aumento 40x.

7.3 Efeitos da suplementação na produção de EROs

O grupo CM apresentou maior produção de EROs que os tratamentos (Fig. 4 e 5). Tanto TTN-LCNC como TTN, na concentração de 1 μM , protegem a célula de maneira mais eficaz contra os danos oxidativos, diminuindo a produção de EROs. A utilização de concentrações mais baixas possui função inversa, sendo notado o aumento do estresse oxidativo ao se utilizar 0,25 μM nos dois tratamentos. O grupo LCNC demonstrou ter o mesmo comportamento que os tratamentos, não sendo inertes no processo, causando a redução da produção de EROs de maneira dose-dependente, com maiores doses oferecendo uma melhor proteção (Fig. 4).

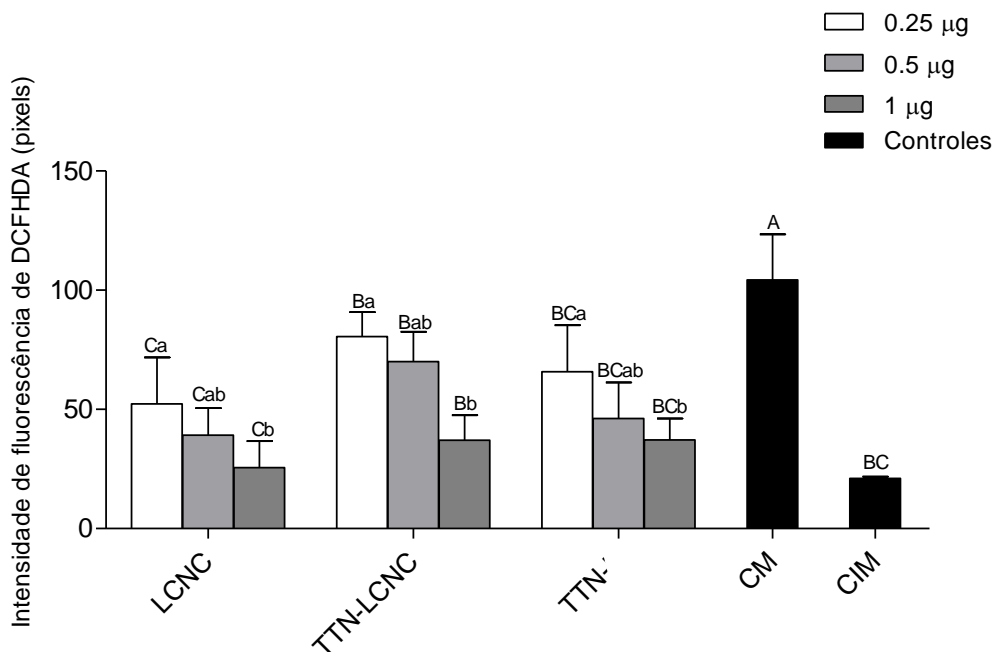


Figura 4 – Produção de EROs nos tratamentos e grupos controles (maturados, imaturos e nanocápsulas). LCNC= suspensão de nanocápsulas; TTN-LCN = tretinoína nanoencapsulada, TTN= tretinoína livre. Letras maiúsculas representam diferença significativa entre os grupos e letras minúsculas, entre as concentrações testadas, $P < 0,05$.

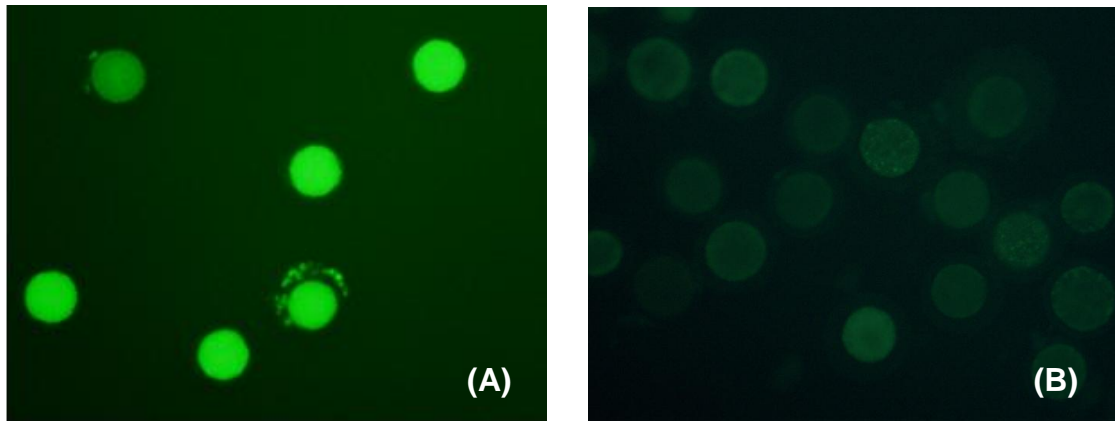


Figura 5 – Formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). (A) Grupo controle maturado (CM); (B) Grupo suplementado com tretinoína nanoencapsulada (TNN-LCNC) na concentração de 1 μ M. Menor intensidade de fluorescência no grupo TNN-LCNC demonstra menor produção de EROs em relação ao grupo CM.

7.4 Efeitos da suplementação na expressão gênica

A expressão, dos genes Mcl-1, HAS-2 e SHC-1, foi analisada tanto em oócitos como nas CC, como pode ser observado nas figuras 6 e 7. Em relação aos oócitos, os genes Mcl-1 e SHC-1 foram mais expressos ($P < 0,05$) no tratamento TTN-LCNC a 0,25 μ M (Fig. 6A e 6C). Em Mcl-1, LCNC e TTN não diferiram ($P > 0,05$) do CIM (Fig. 6A), mas foram diferentes ($P < 0,05$) do CM (Fig. 6A), que apresentou maiores níveis de Mcl-1. Para ambos os genes, foi observado um efeito-dose dependente quando se suplementou com TTN-LCNC (Fig. 6A e 6C).

O gene HAS-2 demonstrou estar sendo mais expresso ($P < 0,05$) em TTN-LCNC a 0,25 μ M, de forma semelhante a LCNC a 0,25 μ M (Fig. 6B). Embora TTN-LCNC tenha induzido maior expressão gênica do que TTN, ambas não diferiram ($P > 0,05$) do grupo LCNC (Fig. 6B).

Em relação as CC, o gene Mcl-1 teve sua atividade transcricional mais ativa no tratamento com TTN a 0,5 e 1 μ M (Fig. 7A), já para HAS-2 o tratamento TTN-LCNC a 0,25 μ M induziu maior expressão, apresentando diferença ($P < 0,05$) em relação ao CM (Fig. 7B), e notando-se novamente o efeito dose-dependente dentro deste grupo. SHC-1 foi mais expresso no CM e após no grupo TTN-LCNC 0,25 μ M, que não diferiu ($P > 0,05$) de TTN a 0,5 μ M (Fig. 7C).

Em resumo, nos oócitos, SHC-1 mostrou maiores níveis de expressão quando se utilizou TTN-LCNC 0,25 μ M, assim como Mcl-1, demonstrando ocorrer a tentativa de prolongar a sobrevivência celular na presença de um estímulo indutor de apoptose. HAS-2, seguindo o mesmo padrão, teve seus maiores níveis no tratamento com TTN-LCNC a 0,25 μ M, o qual não diferiu de LCNC.

Nas CC, o gene HAS-2 demonstrou maior expressão no grupo submetido à suplementação com 0,25 μ M de TTN-LCNC. SHC-1 teve menor expressão nos grupos suplementados com maiores doses de TTN-LCNC, mostrando proteção ao estresse oxidativo, já o CM, sem suplementação, apresentou maior expressão de SHC-1 indicando sofrer maiores danos oxidativos. Para Mcl-1 o tratamento com TTN se mostrou mais eficaz, aumentando seus níveis conforme o aumento da concentração de suplementação.

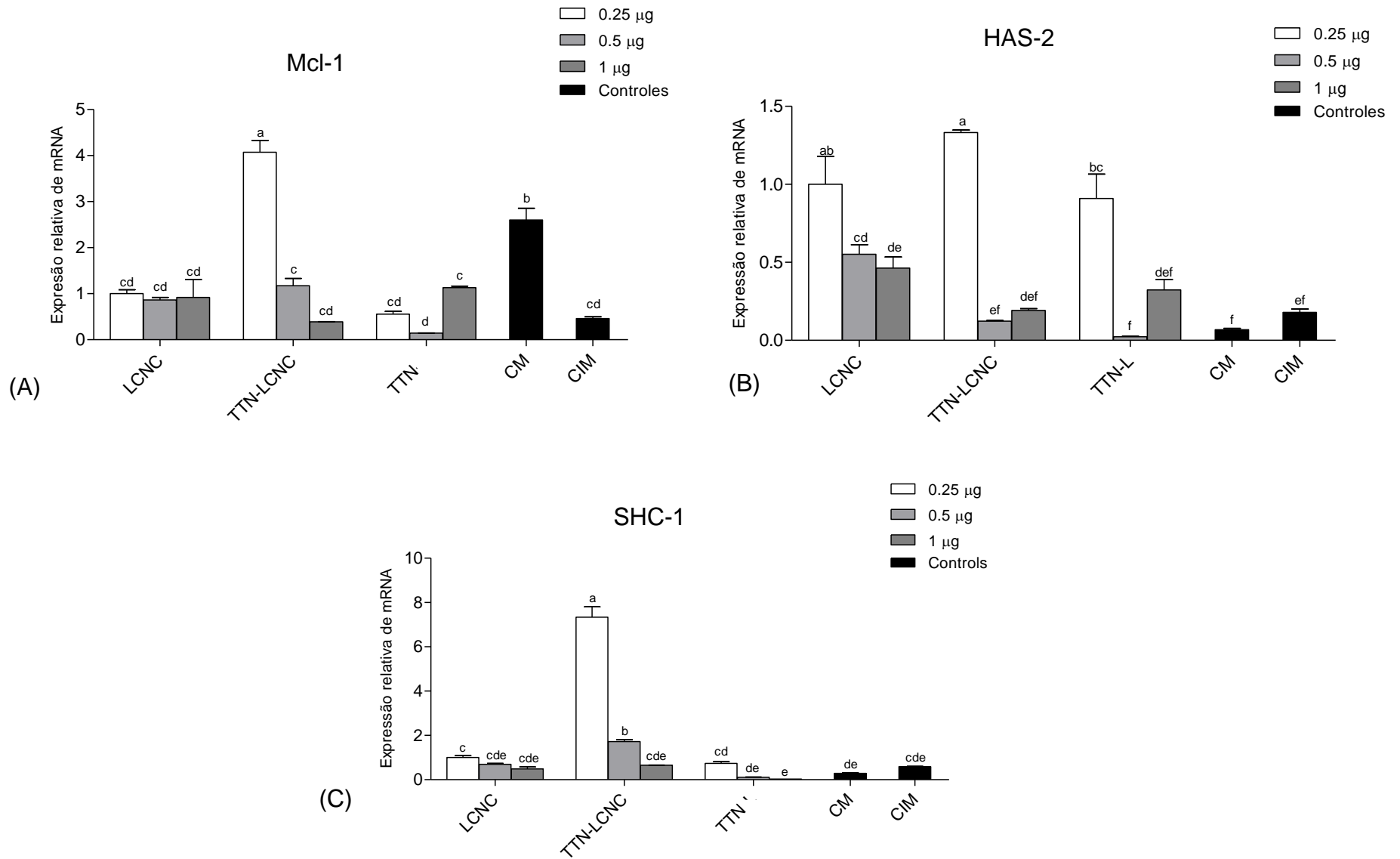


Figura 6 – Expressão gênica de Mcl-1, HAS-2 e SHC-1 nos oócitos submetidos aos tratamentos com TTN e TTN-LCNC. (A) Gráfico da expressão relativa de mRNA para o gene Mcl-1; (B) Gráfico da expressão relativa de mRNA para o gene HAS-2; (C) Gráfico da expressão relativa para o gene SHC-1. Letras acima das barras demonstram diferenças significativas entre os tratamentos. $P < 0,05$

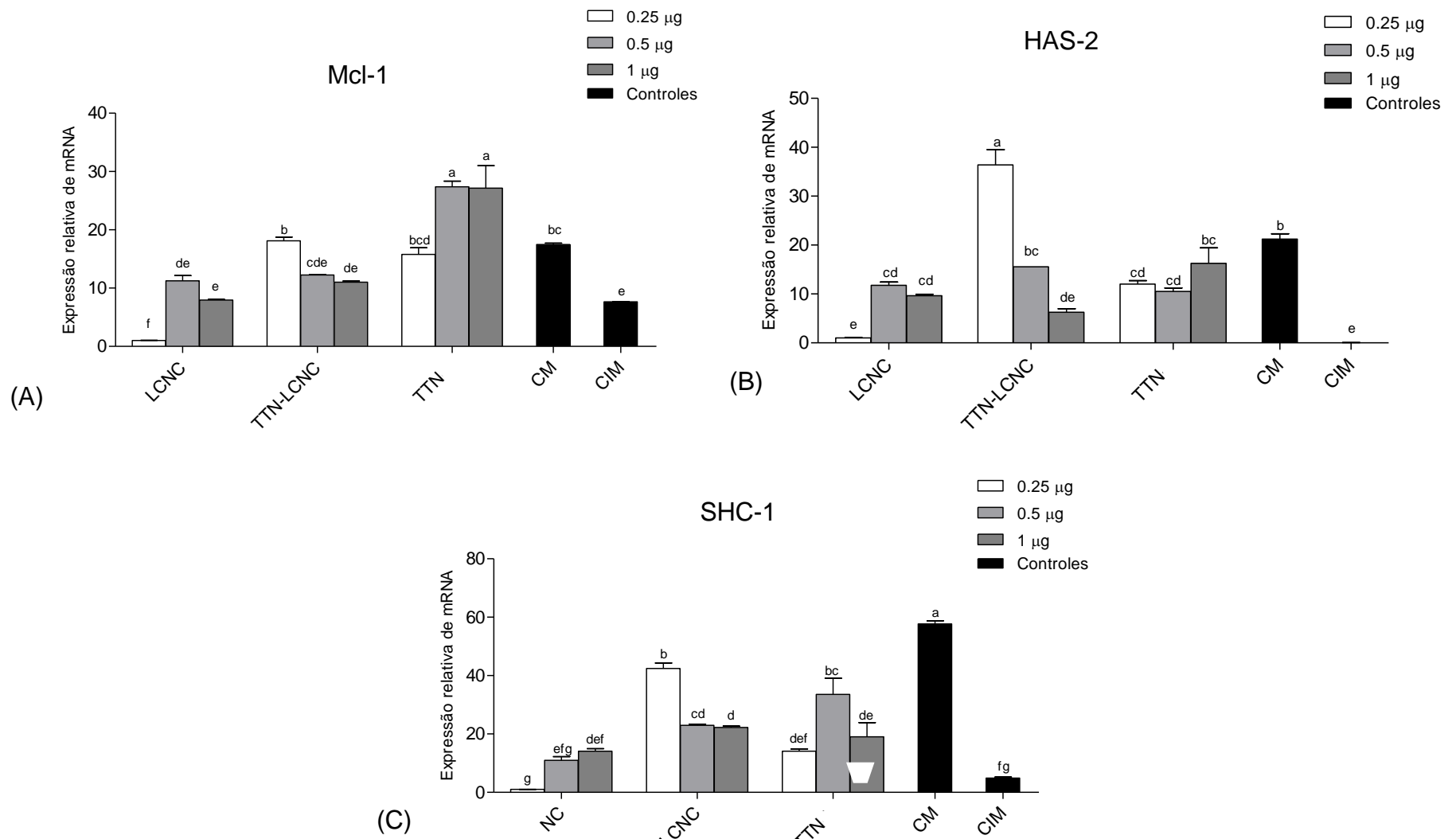


Figura 7 – Expressão gênica de Mcl-1, HAS-2 e SHC-1 nas células do cumulus submetidas aos tratamentos com TTN e TTN-LCNC. (A) Gráfico para expressão relativa de mRNA para o gene Mcl-1; (B) Gráfico para expressão relativa de mRNA para o gene HAS-2; (C) Gráfico para a expressão relativa para o gene SHC-1. Letras acima das barras demonstram diferenças significativas entre os tratamentos. $P < 0,05$

8 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou pela primeira vez os efeitos da suplementação com tretinoína associada a nanocápsulas em CCOs bovinos durante a MIV. Em relação ao teste de viabilidade e toxicidade celular, os oócitos do grupo controle imaturo e dos demais grupos submetidos à manipulação *in vitro* sofrem danos e perda da viabilidade de membrana, ressaltando a importância de suplementos que protejam os CCOs. No entanto, não foi observada diferença entre os grupos suplementados com tretinoína, tretinoína associada a nanocápsulas e o grupo controle maturado.

A formação de EROs em CCOs bovinos submetidos a MIV foram reduzidas ao se utilizar tretinoína nanoencapsulada e livre a 0,5 e 1 μM . Segundo Luvoni et al. (1996) as concentrações de oxigênio empregadas no processo *in vitro* são responsáveis pelo aumento da geração de EROs, causando a fragmentação de DNA, a oxidação de proteínas e a peroxidação lipídica (HASHIMOTO et al., 2000). No entanto, o melhoramento dos protocolos de MIV, através da suplementação com diferentes hormônios, vitaminas e outras moléculas, surge como alternativa para aumentar a eficiência desta biotécnica (LIMA et al., 2006).

Adicionalmente ao resultado anterior, SHC-1 apresentou menores níveis de expressão em oócitos quando se utilizou tretinoína nanoencapsulada e livre a 0,5 e 1 μM , sendo confirmado pelos resultados encontrados para o teste de produção de EROs. Ao realizar a suplementação com tretinoína nanoencapsulada a 0,25 μM se verificou maiores danos oxidativos. Nas CC, SHC-1 teve menor expressão nos grupos suplementados com maiores doses de tretinoína nanoencapsulada, mostrando proteção ao estresse oxidativo. O grupo controle maturado, sem suplementação, apresentou maior expressão de SHC-1 indicando sofrer maiores danos oxidativos. Foi observado também, analisando-se todos os grupos para os

níveis de SHC-1, que sua maior expressão nas CC vai de acordo com o fato de que estas células protegem o oócito da apoptose induzida pelo estresse oxidativo gerado no processo *in vitro* (FATEHI et al., 2005; TATEMOTO; SAKURAI; MUTO, 2000). Os elevados níveis de SHC-1 estão correlacionados com o intenso estresse oxidativo e produção de EROs (FAVETTA et al., 2004; FAVETTA et al., 2007). Além disso, este gene tem sido identificado como uma molécula responsável por interligar os processos de dano oxidativo e apoptose (WU et al., 2006). Seguindo o estudo realizado por Guerin e colaboradores (2001) os retinóides exercem proteção contra os danos oxidativos, mantendo os níveis adequados de compostos e enzimas antioxidantes, confirmando os resultados encontrados ao se utilizar maiores doses de tretinoína nanoencapsulada e livre.

O membro anti-apoptótico da família Bcl-2, o Mcl-1, também apresentou maior expressão quando se utilizou menor concentração de tretinoína nanoencapsulada em oócitos. A alta expressão de Mcl-1 está sendo encontrada em oócitos humanos (GRONDAHL et al., 2010) e a abundância destes transcritos é positivamente correlacionada com a qualidade dos oócitos bovinos (BOUMELA et al., 2011). No entanto, como SHC-1 está relacionado ao estresse oxidativo, enquanto que, o Mcl-1 com a qualidade de oócitos, portanto, é esperado que a expressão desses genes ocorra de maneira diferente. A hipótese é que a super expressão de Mcl-1 pode ser considerada uma tentativa celular de alcançar o prolongamento da sobrevivência quando exposta a um estímulo indutor de apoptose, entretanto, a duração deste mecanismo é de curto-prazo (JOHNSON, 1999).

Tobiume e colaboradores (2001) têm destacado a importância de Mcl-1 no desencadeamento da apoptose devido ao estresse oxidativo. Inoshita e colaboradores (2002) relataram que JNK (Jun N-terminal quinase) fosforila os sítios serina-121 e treonina-163 da proteína Mcl-1 em resposta ao estímulo gerado pela presença de H₂O₂, diminuindo sua ação anti-apoptótica. Mcl-1 é essencial para o desenvolvimento embrionário, visto que blastocistos originados do acasalamento entre camundongos *Mcl-1^{+/-}*, não eclodem e possuem dificuldade de fixação no substrato no qual foram cultivados (RINKENBERGER et al., 1999; PERCIAVALLE et al., 2012).

Para Mcl-1, nas células do *cumulus*, o tratamento com tretinoína livre se mostrou mais eficaz, aumentando seus níveis conforme o aumento da concentração de suplementação. As diferenças encontradas nas características do RNA total entre oócitos e CC estão relacionadas com o fato de que os oócitos, quando dentro dos folículos antrais, são considerados transcricionalmente inativos em relação as CC. Além disso, a presença de material genético materno e o acúmulo de reservas de energia e proteínas durante a fase de crescimento oocitária, aumentam as diferenças entre a atividade transcricional destas células (PAYTON; RISPOLI; EDWARDS, 2010).

Em oócitos, o gene HAS-2, seguindo o padrão dos outros genes, teve seus maiores níveis no tratamento com tretinoína nanoencapsulada a 0,25 μM , o qual não diferiu do tratamento com a suspensão contendo somente nanocápsulas. Nas CC, seguindo o resultado encontrado em oócitos, os níveis de HAS-2 foram maiores no grupo submetido à suplementação com 0,25 μM de tretinoína nanoencapsulada. O gene HAS-2 está envolvido com a síntese de AH e com a formação da matriz extracelular dos CCOs, apresentando expressão diferenciada nas CC de oócitos humanos, sugerindo ser um potencial marcador da competência oocitária (MCKENZIE et al., 2004). A expressão do gene HAS-2 é considerada pré-requisito para o início dos efeitos mediados pelo o AH durante a etapa final de maturação, bem como nas interações espermatozoide-oócito (SCHOENFELDER; EINSPANIER, 2003). No entanto, embora os resultados para a expressão em oócitos foram melhores que no controle maturado, o comportamento não inerte das nanocápsulas precisa ser posteriormente avaliado.

As suspensões contendo tretinoína nanoencapsulada foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (JAGER et al., 2009), utilizando poli-(ϵ -caprolactona) (PCL) como matriz polimérica e monoestato de sorbitano no núcleo das nanocápsulas, disperso no triglicérideo dos ácidos cáprico e caprílico (OURIQUE et al., 2008). A utilização de polímeros pré-formados evita a falta de controle da massa molecular e da polidispersão do polímero obtido, presença de monômeros tóxicos residuais e reações cruzadas com o fármaco, ou ainda, a possibilidade de inativação do último (SCHAFFAZICK, 2006). Hsien-Yi Lo e colaboradores (2010) realizaram teste de citotoxicidade, avaliando a liberação da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH) em células incubadas com PCL. Em

comparação ao controle, sem a presença de PCL, não houve diferenças estatísticas, indicando que PCL não foi tóxico para as células (HSIEN-YI; HSUAN-TING; YI-YOU, 2010).

O efeito-dose dependente verificado no presente estudo, quando se utilizou tretinoína nanoencapsulada, demonstra uma liberação controlada da molécula e a sua menor degradabilidade. Entretanto, para a ação antioxidante dos componentes da suspensão de nanocápsulas e sua influência na expressão gênica não há conhecimento de estudos realizados. O nanoencapsulamento, o qual é uma nova estratégia de liberação de drogas, otimiza a eficácia de muitos agentes terapêuticos, aumentando a eficiência do tratamento devido a uma maior biodisponibilidade do fármaco (SHAH et al., 2007).

9 CONCLUSÃO

A TTN-LCNC aumenta a expressão de HAS-2 nas CC, e diminui a produção de EROs, quando adicionada em maiores doses (0,5 e 1 μM), sugerindo proteção antioxidante. Além disso, o nanoencapsulamento gera efeito dose-dependente quando se analisa a expressão gênica, proporcionando a liberação mais lenta e menor degradabilidade do composto, aumentando a eficiência da suplementação. Entretanto outros ensaios adicionais, como a FIV, são necessários para analisar a atividade da TTN-LCNC no desenvolvimento embrionário.

Referências

- ABBOTT, A. L.; DUCIBELLA, T. Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. **Front Biosci.**, v.6, p.D792-D806, 2001.
- ABE, H.; HOSHI, H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. **J.Reprod.Dev.**, v.49, n.3, p.193-202, 2003.
- ACHKAR, C.C.; BENTEL, J.M.; BOYLAN, J.F.; SCHER, H.I.; GUDAS, L.J.; MILLER JR.; W.H. Differences in the pharmacokinetic properties of orally administered all-transretinoic acid and 9-cis-retinoic acid in the plasma of nude mice. **Drug Metab. Dispos**, v.22, p. 451–458, 1994.
- ALBARRACIN, J. L.; MORATO, R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T. Effects of roscovitine on the nuclear and cytoskeletal components of calf oocytes and their subsequent development. **Theriogenology**, v.64, n.8, p.1740-1755, 2005.
- ALI, A.; SIRARD, M. A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. **Biol.Reprod.**, v.66, n.4, p.901-905, 2002.
- ALI, A. A.; BILODEAU, J. F.; SIRARD, M. A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v.59, n.3-4, p.939-949, 2003.
- ALMINANA, C.; GIL, M. A.; CUELLO, C.; CABALLERO, I.; ROCA, J.; VAZQUEZ, J. M.; GOMEZ, E.; MARTINEZ, E. A. In vitro maturation of porcine oocytes with retinoids improves embryonic development. **Reprod.Fertil.Dev.**, v.20, n.4, p.483-489, 2008.
- ALMOUAZEN,E.; BOURGEOIS,S.; BOUSSAID,A.; VALOT,P.; MALLEVAL,C.; FESSI,H.; NATAF,S.; BRIANCON,S. Development of a nanoparticle-based system for the delivery of retinoic acid into macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v.430, p.207– 215, 2012.
- ASSIDI, M.; DUFORT, I.; ALI, A.; HAMEL, M.; ALGRIANY, O.; DIELEMANN, S.; SIRARD, M. A. Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate in vitro. **Biol.Reprod.**, v.79, n.2, p.209-222, 2008.
- BAREKATI, Z.; GOURABI, H.; VALOJERDI, M. R.; YAZDI, P. E. Previous maternal chemotherapy by cyclophosphamide (Cp) causes numerical chromosome abnormalities in preimplantation mouse embryos. **Reprod.Toxicol.**, v.26, n.3-4, p.278-281, 2008.
- BÉZARD, J. Aspects of in vivo and *in vitro* fertilization of the equine oocyte. **Arquivos da Faculdade Veterinária**, v. 25, n.1, p36-61, 1997BILODEAU, S.;

BILODEAU-GOESEELS, S. Bovine Oocyte Meiotic Inhibition Before In Vitro Maturation and Its Value to In Vitro Embryo Production: Does it Improve Developmental Competence? **Reprod.Domest.Anim**, v.47, n.4, p.687-693, 2012.

BOUMELA, I.; ASSOU, S.; AOUACHERIA, A.; HAOUZI, D.; DECHAUD, H.; DE, V. J.; HANDYSIDE, A.; HAMAMAH, S. Involvement of BCL2 family members in the regulation of human oocyte and early embryo survival and death: gene expression and beyond. **Reproduction.**, v.141, n.5, p.549-561, 2011.

BRISAERT, M.; GABRIELS, M.; MATTHIJS, V.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Liposomes with tretinoin: a physical and chemical evaluation. **J.Pharm.Biomed.Anal.**, v.26, n.5-6, p.909-917, 2001.

BUKOWSKA, D.; KEMPISTY, B.; PIOTROWSKA, H.; ZAWIERUCHA, P.; BRUSSOW, K. P.; JASKOWSKI, J. M.; NOWICKI, M. The in vitro culture supplements and selected aspects of canine oocytes maturation. **Pol.J.Vet.Sci.**, v.15, n.1, p.199-205, 2012.

CALDER, M. D.; CAVENEY, A. N.; SIRARD, M. A.; WATSON, A. J. Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation in vitro. **Fertil.Steril.**, v.83 Suppl 1, p.1077-1085, 2005.

CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SERAPIÃO, R.V.; RAMOS, A.A.; MACHADO, M.A.; VALE FILHO, V.R.; ANDRADE, V.J. Identificação do sexo de embriões bovinos fecundados *in vitro* e cultivados com células do *cumulus* na presença de soro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.407-409, 2003.

CHA, K. Y.; CHIAN, R. C. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. **Hum.Reprod.Update.**, v.4, n.2, p.103-120, 1998.

CHAMBON, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. **Faseb journal**, v. 10, p. 940–954, 1996.

CHIAN, R. C.; CHUNG, J. T.; DOWNEY, B. R.; TAN, S. L. Maturation and developmental competence of immature oocytes retrieved from bovine ovaries at different phases of folliculogenesis. **Reprod.Biomed.Online.**, v.4, n.2, p.127-132, 2002.

CHIAN, R. C.; NIWA, K.; SIRARD, M. A. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes in vitro. **Theriogenology**, v.41, n.7, p.1499-1508, 1994.

COLGAN, D. F.; MURTHY, K. G.; PRIVES, C.; MANLEY, J. L. Cell-cycle related regulation of poly(A) polymerase by phosphorylation. **Nature**, v.384, n.6606, p.282-285, 1996.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. In vitro follicle growth: achievements in mammalian species. **Reprod.Domest.Anim**, v.36, n.1, p.3-9, 2001.

CRAN, D.G.; MOOR, R.M. Programming the oocyte for fertilization. **Fertilization in mammals**, n.4, p.35-50, 1990.

DARMANIN, S.; CHEN, J.; ZHAO, S.; CUI, H.; SHIRKOOHI, R.; KUBO, N.; KUGE, Y.; TAMAKI, N.; NAKAGAWA, K.; HAMADA, J.; MORIUCHI, T.; KOBAYASHI, M. All-trans retinoic acid enhances murine dendritic cell migration to draining lymph nodes via the balance of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **J. Immunol**, v. 179, p. 4616–4625, 2007.

DE, L. F.; VAN, V. C.; VAN, M. P.; KRUIP, T. A. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Res.**, v.24, n.2, p.197-204, 1989.

DE, S., V; CROZET, N.; GALL, L. Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. **J.Exp.Zool.**, v.269, n.2, p.128-139, 1994.

DE, V. A.; VAN, D., V; JORIS, H.; VAN, S. A. In-vitro matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection. **Hum.Reprod.**, v.14, n.7, p.1859-1863, 1999.

DEB, G. K.; DEY, S. R.; BANG, J. I.; CHO, S. J.; PARK, H. C.; LEE, J. G.; KONG, I. K. 9-cis retinoic acid improves developmental competence and embryo quality during in vitro maturation of bovine oocytes through the inhibition of oocyte tumor necrosis factor-alpha gene expression. **J.Anim Sci.**, v.89, n.9, p.2759-2767, 2011.

DOWNS, S. M.; EPPIG, J. J. The role of purines in the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes. **Tokai J.Exp.Clin.Med.**, v.11, n.6, p.463-469, 1986.

EL-RAEY, M.; GESHI, M.; SOMFAI, T.; KANEDA, M.; HIRAKO, M.; ABDEL-GHAFFAR, A. E.; SOSA, G. A.; EL-ROOS, M. E.; NAGAI, T. Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation in vitro in cattle. **Mol.Reprod.Dev.**, v.78, n.4, p.250-262, 2011.

EPPIG, J. J.; WARD-BAILEY, P. F.; COLEMAN, D. L. Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. **Biol.Reprod.**, v.33, n.5, p.1041-1049, 1985.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Mol.Reprod.Dev.**, v.42, n.4, p.437-442, 1995.

FAN, H. Y.; SUN, Q. Y. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. **Biol.Reprod.**, v.70, n.3, p.535-547, 2004.

FATEHI, A. N.; ROELEN, B. A.; COLENBRANDER, B.; SCHOEVERS, E. J.; GADELLA, B. M.; BEVERST, M. M.; VAN DEN HURK, R. Presence of cumulus cells during in vitro fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. **Zygote.**, v.13, n.2, p.177-185, 2005.

FAVETTA, L. A.; ROBERT, C.; ST JOHN, E. J.; BETTS, D. H.; KING, W. A. p66shc, but not p53, is involved in early arrest of in vitro-produced bovine embryos. **Mol.Hum.Reprod.**, v.10, n.6, p.383-392, 2004.

FAVETTA, L. A.; ST JOHN, E. J.; KING, W. A.; BETTS, D. H. High levels of p66shc and intracellular ROS in permanently arrested early embryos. **Free Radic.Biol.Med.**, v.42, n.8, p.1201-1210, 2007.

FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v.71, n.5, p.836-848, 2009.

FORTIER, M. A.; SIRARD, M. A. Effect of adenylate cyclase stimulation on meiotic resumption and cyclic AMP content of zona-free and cumulus-enclosed bovine oocytes in vitro. **J.Reprod.Fertil.**, v.97, n.1, p.5-11, 1993. FUKUI, Y. Effects of sera and steroid hormones on development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviduct epithelial cells. **J.Anim Sci.**, v.67, n.5, p.1318-1323, 1989.

GANDOLFI, F.; BREVINI, T. A. RFD Award Lecture 2009. In vitro maturation of farm animal oocytes: a useful tool for investigating the mechanisms leading to full-term development. **Reprod.Fertil.Dev.**, v.22, n.3, p.495-507, 2010.

GANDOLFI, T. A.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v.55, n.6, p.1255-1276, 2001.

GAVIN, A. C.; SCHORDERET-SLATKINE, S. Ribosomal S6 kinase p90rsk and mRNA cap-binding protein eIF4E phosphorylations correlate with MAP kinase activation during meiotic reinitiation of mouse oocytes. **Mol.Reprod.Dev.**, v.46, n.3, p.383-391, 1997.

GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v.67, n.1, p.6-15, 2007.

GOMEZ, E.; RODRIGUEZ, A.; GOYACHE, F.; DIEZ, C.; JOSE, R. L.; MOREIRA, P. N.; NESTOR, C. J.; MORAN, E.; GUTIERREZ-ADAN, A. Retinoid-dependent mRNA expression and poly-(A) contents in bovine oocytes meiotically arrested and/or matured in vitro. **Mol.Reprod.Dev.**, v.69, n.1, p.101-108, 2004.

GOTTARD, F.P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Rev Bras Reprod Anim**, v.33, n.2, p.82-94, 2009.

GRONDAHL, M. L.; YDING, A. C.; BOGSTAD, J.; NIELSEN, F. C.; MEINERTZ, H.; BORUP, R. Gene expression profiles of single human mature oocytes in relation to age. **Hum.Reprod.**, v.25, n.4, p.957-968, 2010.

GUERIN, P.; EL, M. S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Hum.Reprod.Update.**, v.7, n.2, p.175-189, 2001.

HANNA, C. B.; YAO, S.; WU, X.; JENSEN, J. T. Identification of phosphodiesterase 9A as a cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase in germinal vesicle oocytes: a proposed role in the resumption of meiosis. **Fertil.Steril.**, 2012.

HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; TAKAKURA, R.; YAMADA, M.; IMAI, H.; KASHIMA, N. Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. **Mol.Reprod.Dev.**, v.57, n.4, p.353-360, 2000.

HATTORI, M.; TAKESUE, K.; NISHIDA, N.; KATO, Y.; FUJIHARA, N. Inhibitory effect of retinoic acid on the development of immature porcine granulosa cells to mature cells. **J.Mol.Endocrinol.**, v.25, n.1, p.53-61, 2000.

HIDALGO, C. O.; DIEZ, C.; DUQUE, P.; FACAL, N.; GOMEZ, E. Pregnancies and improved early embryonic development with bovine oocytes matured in vitro with 9-cis-retinoic acid. **Reproduction.**, v.125, n.3, p.409-416, 2003.

HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote.**, v.5, n.4, p.371-376, 1997.

HSIEN-YI L.; HSUAN-TING, KUO.; YI-YOU HUANG. Application of polycaprolactone as an anti-adhesion biomaterial film. **ARTIFICIAL ORGAN**, v. 34, p.648-653, 2010.

HYTTEL P, FAIR T, CALLESEN H, GREVE T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, p. 23– 32, 1997.

IKEDA, S.; ICHIHARA-TANAKA, K.; AZUMA, T.; MURAMATSU, T.; YAMADA, M. Effects of midkine during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent developmental competence. **Biol.Reprod.**, v.63, n.4, p.1067-1074, 2000.

INOSHITA, S.; TAKEDA, K.; HATAI, T.; TERADA, Y.; SANO, M.; HATA, J.; UMEZAWA, A.; ICHIJO, H. Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress. **J.Biol.Chem.**, v.277, n.46, p.43730-43734, 2002.

IRVING-RODGERS, H.F.; RODGERS, R.J. Extracellular matrix in ovarian follicular development and disease. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 322, n. 1, p. 89-98, 2005.

IZADYAR, F.; HAGE, W. J.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. **Mol.Reprod.Dev.**, v.49, n.4, p.444-453, 1998.

JAGER, E.; VENTURINI, C. G.; POLETTO, F. S.; COLOME, L. M.; POHLMANN, J. P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **J.Biomed.Nanotechnol.**, v.5, n.1, p.130-140, 2009.

JOHNSON, A. L. Mcl-1--just another antiapoptotic Bcl-2 Homolog? **Endocrinology**, v.140, n.12, p.5465-5468, 1999.

KANG, S.; STUART, E.; DENMAN, A.R.; MORRISON, S.; YU, Z.; MCSWEENEY, C.S. An Efficient RNA Extraction Method for Estimating Gut Microbial Diversity by Polymerase Chain Reaction. **Current Microbiology**, v. 58, p. 464–471, 2009.

KRISHER, R. L.; BAVISTER, B. D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v.49, n.1, p.103-114, 1998.

LABHASETWAR, V.; SONG, C.; LEVY, R. J. Nanoparticle drug delivery system for restenosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 24, p.63-85, 1997.

LARSON, J. E.; KRISHER, R. L.; LAMB, G. C. Effects of supplemental progesterone on the development, metabolism and blastocyst cell number of bovine embryos produced in vitro. **Reprod.Fertil.Dev.**, v.23, n.2, p.311-318, 2011.

LEHMKUHL, R. C.; MEZZALIRA A.; VIEIRA A. D.; BARBIERI, D.P; MACHADO, M. F.; RUBIN, M. I. B. & SILVA, C. A. M. Viabilidade de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular. **Ars Veterinaria**, v. 18, p.273-279, 2002.

LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M. A.; SANTOS, M. H.; REICHENBACH, H. D.; WEPPERT, M.; PAULA-LOPES, F. F.; NETO, C. C.; GONCALVES, P. B. Effect of retinoids and growth factor on in vitro bovine embryos produced under chemically defined conditions. **Anim Reprod.Sci.**, v.95, n.3-4, p.184-192, 2006.

LONERGAN, P.; FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, n.1, p.17-22, 2008.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M. P. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression - experience from animal studies. **Reprod.Biomed.Online.**, v.7, n.6, p.657-663, 2003.

LUVONI, G. C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B. G. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. **Mol.Reprod.Dev.**, v.43, n.4, p.437-443, 1996.

MACHACA, K. Ca²⁺ signaling differentiation during oocyte maturation. **J.Cell Physiol**, v.213, n.2, p.331-340, 2007.

MACHADO, G.; FIGUEIREDO, F. Revisão: FILAMENTOS intermediários. **Medicina**, v. 29, p. 104-113, 1996.

MAREI, W. F.; GHAFARI, F.; FOULADI-NASHTA, A. A. Role of hyaluronic acid in maturation and further early embryo development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.78, n.3, p.670-677, 2012.

MATTIOLI, M.; BARBONI, B. Signal transduction mechanism for LH in the cumulus-oocyte complex. **Mol.Cell Endocrinol.**, v.161, n.1-2, p.19-23, 2000.

MCKENZIE, L. J.; PANGAS, S. A.; CARSON, S. A.; KOVANCI, E.; CISNEROS, P.; BUSTER, J. E.; AMATO, P.; MATZUK, M. M. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. **Hum.Reprod.**, v.19, n.12, p.2869-2874, 2004.

MERDASSI, G.; MAZOYER, C.; GUERIN, J. F.; SAAD, A.; SALLE, B.; LORNAGE, J. Examination of viability and quality of ovarian tissue after cryopreservation using simple laboratory methods in ewe. **Reprod.Biol.Endocrinol.**, v.9, p.78, 2011.

MINEGISHI, T.; HIRAKAWA, T.; KISHI, H.; ABE, K.; TANO, M.; ABE, Y.; MIYAMOTO, K. The mechanisms of retinoic acid-induced regulation on the follicle-stimulating hormone receptor in rat granulosa cells. **Biochim.Biophys.Acta**, v.1495, n.3, p.203-211, 2000.

MINGOTI, G. Z.; CAIADO CASTRO, V. S.; MEO, S. C.; BARRETTO, L. S.; GARCIA, J. M. The effect of interaction between macromolecule supplement and oxygen tension on bovine oocytes and embryos cultured in vitro. **Zygote.**, v.17, n.4, p.321-328, 2009.

MOHAN, M.; MALAYER, J. R.; GEISERT, R. D.; MORGAN, G. L. Expression of retinol-binding protein messenger RNA and retinoic acid receptors in preattachment bovine embryos. **Mol.Reprod.Dev.**, v.60, n.3, p.289-296, 2001.

MOHAN, M.; MALAYER, J. R.; GEISERT, R. D.; MORGAN, G. L. Expression patterns of retinoid X receptors, retinaldehyde dehydrogenase, and peroxisome proliferator activated receptor gamma in bovine preattachment embryos. **Biol.Reprod.**, v.66, n.3, p.692-700, 2002.

MONGAN, N. P.; GUDAS, L. J. Diverse actions of retinoid receptors in cancer prevention and treatment. **Differentiation**, v.75, n.9, p.853-870, 2007.

MORADO, S. A.; CETICA, P. D.; BECONI, M. T.; DALVIT, G. C. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. **Reprod.Fertil.Dev.**, v.21, n.4, p.608-614, 2009.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A.; Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **Int. J. Pharm.**, v.385, p. 113–142, 2010.

MORRIS-KAY, G. M.; WARD, S. J. Retinoids and mammalian development. **Int.Rev.Cytol.**, v.188, p.73-131, 1999..

NAMEKAWA, T.; IKEDA, S.; SUGIMOTO, M.; KUME, S. Effects of astaxanthin-containing oil on development and stress-related gene expression of bovine embryos exposed to heat stress. **Reprod.Domest.Anim**, v.45, n.6, p.e387-e391, 2010.

OPIELA, J.; KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; LIPINSKI, D.; SLOMSKI, R.; BZOWSKA, M.; RYNSKA, B. Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. **Theriogenology**, v.69, n.5, p.546-555, 2008.

OURIQUE, A. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **Int.J.Pharm.**, v.352, n.1-2, p.1-4, 2008.

OURIQUE, A. F.; MELERO, A.; DE BONA, C.; SCHAEFER, U. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; LEHR, C. M.; KOSTKA, K. H.; BECK, R. C. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: development of a semisolid nanomedicine. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 79, p. 95-101, 2011.

PAYNE, C.; SCHATTEEN, G. Golgi dynamics during meiosis are distinct from mitosis and are coupled to endoplasmic reticulum dynamics until fertilization. **Dev.Biol.**, v.264, n.1, p.50-63, 2003.

PAYTON, R. R.; RISPOLI, L. A.; EDWARDS, J. L. General features of certain RNA populations from gametes and cumulus cells. **J.Reprod.Dev.**, v.56, n.6, p.583-592, 2010.

PERCIAVALLE, R. M.; STEWART, D. P.; KOSS, B.; LYNCH, J.; MILASTA, S.; BATHINA, M.; TEMIROV, J.; CLELAND, M. M.; PELLETIER, S.; SCHUETZ, J. D.; YOULE, R. J.; GREEN, D. R.; OPFERMAN, J. T. Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. **Nat.Cell Biol.**, v.14, n.6, p.575-583, 2012.

PFÄFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFFLE, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res.**, v.30, n.9, p.e36, 2002.

RIGOPOULOS, D.; IOANNIDES, D.; KALOGEROMITROS, D.; KATSAMBAS, A.; Comparison of topical retinoids in the treatment of acne. **Clin. Dermatol.** V. 22, p. 408–411, 2004.

RUSSELL, D. F.; BAQIR, S.; BORDIGNON, J.; BETTS, D. H. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Mol.Reprod.Dev.**, v.73, n.10, p.1255-1270, 2006.

SCHAFFAZICK, SCHEILA. **Desenvolvimento Tecnológico e avaliação da atividade antioxidante de sistemas nano e microparticulados contendo melatonina**. 2006. 252 f. Tese- Doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SCHOENFELDER, M.; EINSPIANIER, R. Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. **Biol.Reprod.**, v.69, n.1, p.269-277, 2003.

SCHWEIGERT, F. J.; ZUCKER, H. Concentrations of vitamin A, beta-carotene and vitamin E in individual bovine follicles of different quality. **J.Reprod.Fertil.**, v.82, n.2, p.575-579, 1988.

SHAH, K. A.; DATE, A. A.; JOSHI, M. D.; PATRAVALE, V. B. Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: potential in topical delivery. **Int.J.Pharm.**, v.345, n.1-2, p.163-171, 2007.

SIRARD, M. A. Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. **J.Assist.Reprod.Genet.**, v.28, n.6, p.483-488, 2011.

SOMFAI, T.; INABA, Y.; WATANABE, S.; GESHI, M.; NAGAI, T. Follicular fluid supplementation during in vitro maturation promotes sperm penetration in bovine oocytes by enhancing cumulus expansion and increasing mitochondrial activity in oocytes. **Reprod.Fertil.Dev.**, v.24, n.5, p.743-752, 2012.

SORIA, G. F. **Embriões bovinos desenvolvidos em sistemas de cultivos quimicamente definidos ou suplementados com fontes protéicas**. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

STEIN, A. Decreasing variability in your cell culture. **Biotechniques**, v.43, n.2, p.228-229, 2007.

STERN, R.; ASARI, A. A.; SUGAHARA, K. N. Hyaluronan fragments: an information-rich system. **Eur.J.Cell Biol.**, v.85, n.8, p.699-715, 2006.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONCALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biol.Reprod.**, v.64, n.3, p.904-909, 2001.

TAKAHASHI, Y.; FIRST, N. L. In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. **Theriogenology**, v.37, n.5, p.963-978, 1992.

- TANG, X. H.; GUDAS, L. J. Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. **Annu.Rev.Pathol.**, v.6, p.345-364, 2011.
- TANGHE, S.; VAN, S. A.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M.; DE, K. A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Mol.Reprod.Dev.**, v.61, n.3, p.414-424, 2002.
- TARAZONA, A. M.; RODRIGUEZ, J. I.; RESTREPO, L. F.; OLIVERA-ANGEL, M. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. **Reprod.Domest.Anim**, v.41, n.1, p.5-11, 2006.
- TATEMOTO, H.; SAKURAI, N.; MUTO, N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells. **Biol.Reprod.**, v.63, n.3, p.805-810, 2000.
- TESTART, J. [Criteria for evaluating the quality of ovocytes and their aptitude for IVF]. **Ann.Biol.Clin.(Paris)**, v.43, n.1, p.17-21, 1985.
- TIRONE, E.; D'ALESSANDRIS, C.; HASCALL, V. C.; SIRACUSA, G.; SALUSTRI, A. Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle-stimulating hormone (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor beta1). **J.Biol.Chem.**, v.272, n.8, p.4787-4794, 1997.
- TOBIUME, K.; MATSUZAWA, A.; TAKAHASHI, T.; NISHITOH, H.; MORITA, K.; TAKEDA, K.; MINOWA, O.; MIYAZONO, K.; NODA, T.; ICHIJO, H. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. **EMBO Rep.**, v.2, n.3, p.222-228, 2001.
- TOMEK, W.; TORNER, H.; KANITZ, W. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. **Reprod.Domest.Anim**, v.37, n.2, p.86-91, 2002.
- VAN, S. A.; TANGHE, S.; DE, P., I; MAES, D.; DE, K. A. Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. **Reprod.Domest.Anim**, v.37, n.3, p.144-151, 2002.
- VAN, S. A.; WYDOOGHE, E.; HERAS, S.; VANDAELE, L. Alternative models for the study of embryo-maternal cross-talk and signaling molecules from fertilisation to implantation. **Reprod.Fertil.Dev.**, v.23, n.8, p.iii-iv, 2011.
- WERT, S. E.; LARSEN, W. J. Meiotic resumption and gap junction modulation in the cultured rat cumulus-oocyte complex. **Gamete Res.**, v.22, n.2, p.143-162, 1989.
- WU, Z.; ROGERS, B.; KACHI, S.; HACKETT, S. F.; SICK, A.; CAMPOCHIARO, P. A. Reduction of p66Shc suppresses oxidative damage in retinal pigmented epithelial cells and retina. **J.Cell Physiol**, v.209, n.3, p.996-1005, 2006.

YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P. E.; PRESICCE, G. A. Control of oocyte maturation in cows--biological factors. **Theriogenology**, v.49, n.2, p.471-482, 1998.

ZHANG, M.; SU, Y. Q.; SUGIURA, K.; XIA, G.; EPPIG, J. J. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science**, v.330, n.6002, p.366-369, 2010.

ZHENG, P.; SI, W.; BAVISTER, B. D.; YANG, J.; DING, C.; JI, W. 17Beta-estradiol and progesterone improve in-vitro cytoplasmic maturation of oocytes from unstimulated prepubertal and adult rhesus monkeys. **Hum.Reprod.**, v.18, n.10, p.2137-2144, 2003.