

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**MATURAÇÃO OVOCITÁRIA IN VITRO AVALIADA CONFORME SISTEMAS DE  
CULTIVO BIDIMENSIONAL E TRIDIMENSIONAL**

**José Pires Ribeiro Júnior**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho**

**Uberlândia, MG, Brasil**

**Julho de 2020**

JOSÉ PIRES RIBEIRO JÚNIOR

MATURAÇÃO OVOCITÁRIA IN VITRO AVALIADA CONFORME SISTEMAS DE  
CULTIVO BIDIMENSIONAL E TRIDIMENSIONAL

Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em  
Ciências da Saúde junto à Universidade Federal de  
Uberlândia.

**Uberlândia, MG, Brasil**

**Julho de 2020**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

R484 2020	<p>Ribeiro Júnior, José Pires, 1966- Maturação Ovocitária In Vitro Avaliada Conforme Sistemas de Cultivo Bidimensional e Tridimensional [recurso eletrônico] / José Pires Ribeiro Júnior. - 2020.</p> <p>Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências da Saúde. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.842">http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.842</a> Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Ciências médicas. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo , 1962-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências da Saúde. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 61</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
 Av. Pará, 1720, Bloco 2H, Sala 09 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: 34 3225-8628 - www.ppcsa.famed.ufu.br - copme@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Tese de Doutorado Nº 009/PPCSA				
Data:	14.10.2020	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	17:30h
Matrícula do Discente:	11613CSD006				
Nome do Discente:	José Pires Ribeiro Júnior				
Título do Trabalho:	MATURAÇÃO OVOCITÁRIA IN VITRO AVALIADA CONFORME SISTEMAS DE CULTIVO BIDIMENSIONAL E TRIDIMENSIONAL				
Área de concentração:	Ciências da Saúde				
Linha de pesquisa:	3: Fisiopatologia das doenças e agravos à saúde				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Aplicações da nanobiotecnologia em doenças infecciosas, parasitárias e crônico-degenerativas				

Reuniu-se em web conferência pela plataforma Mconf-RNP, em conformidade com a PORTARIA Nº 36, DE 19 DE MARÇO DE 2020 da COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - CAPES, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Kele Amaral Alves (Centro Universitário do Triângulo), Benner Geraldo Alves (UFG), Ricarda Maria Dos Santos (UFU), Angélica Lemos Debs Diniz (UFU) e Luiz Ricardo Goulart Filho (UFU) orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Ricardo Goulart Filho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 14/10/2020, às 17:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Angélica Lemos Debs Diniz, Professor(a) do Magistério Superior**, em 14/10/2020, às 17:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricarda Maria dos Santos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 14/10/2020, às 17:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **BENNER GERALDO ALVES, Usuário Externo**, em 14/10/2020, às 17:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kele Amaral Alves, Usuário Externo**, em 14/10/2020, às 17:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2319571** e o código CRC **01ADA182**.

## RESUMO

O sucesso da produção *in vitro* de embriões está diretamente ligado à qualidade dos ovócitos e as condições de cultivo *in vitro*. Na primeira etapa da produção denominada maturação, que se refere à cultura *in vitro* de ovócitos imaturos, os ovócitos são selecionados e recebem estímulos, das aspiração folicular e da composição provenientes do meio no qual estão inseridos para evolução da meiose, envolvendo alterações nucleares e citoplasmáticas essenciais para a fecundação e posterior desenvolvimento embrionário. Entretanto as taxas de produtividade se mantêm estacionadas e novos estudos devem ser conduzidos com a finalidade de melhorar a qualidade dos ovócitos após a fase de maturação *in vitro*. Dessa forma, este estudo foi conduzido com dois experimentos distintos com o objetivo de: 1- Avaliar a maturação de ovócitos bovinos com ou sem células do cúmulus em sistemas de cultivo *in vitro* tridimensional com uso de matriz de colágeno e comparar o sistema tradicional bidimensional; 2- Comparar os métodos de avaliação visual em microscópio invertido e por microscopia de fluorescência após o processo de maturação ovocitária. O percentual de ovócitos em vesícula germinativa foi superior nos sem células do cúmulus. Os ovócitos com células do cúmulus em sistema tridimensional de cultivo apresentou menor percentual de ovócitos em metáfase I. Adicionalmente, as taxas de metáfase II foram superiores nos com células do cúmulus independente do sistema de cultivo. Em adição, a porcentagem de ovócitos rompidos foi superior no com células do cúmulus em cultivo 3D em relação aos demais. Diferentes abordagens foram utilizadas para a avaliação da cromatina do ovócito pós-maturação. Na avaliação por microscópio invertido, os parâmetros presença do corpúsculo polar e extrusão foram avaliados. No geral, o com células do cúmulus em sistema 3D apresentou maior porcentagem de ovócitos com extrusão de corpúsculo polar. Os parâmetros analisados vesícula germinativa (microscopia fluorescência) versus ausência de corpúsculo polar (microscópio invertido) e metáfase II (microscopia fluorescência) versus presença de corpúsculo polar (microscópio invertido) foram comparados entre as abordagens utilizadas: microscopia fluorescência verso microscópio invertido. No geral, a porcentagem de ovócitos em vesícula germinativa (microscopia fluorescência) foi menor em comparação a proporção de ovócitos observados com ausência de corpúsculo polar (microscópio invertido). Em contrapartida, a porcentagem de ovócitos em metáfase II (microscopia fluorescência) foi superior em relação àqueles identificados com presença de corpúsculo polar (microscópio invertido). Em síntese, considerando os resultados obtidos por meio da análise de microscopia fluorescência (eletivo como padrão ouro), a retomada da meiose após o cultivo *in vitro* de ovócitos com células do cúmulus foi semelhante entre os sistemas 2D e 3D. Dentro do mesmo sistema avaliado (2D ou 3D), a ausência de células do cúmulus comprometeu a retomada da meiose. Em adição, ovócitos maturados no sistema 3D apresentaram maior ocorrência de danos na zona pelúcida.

**Palavras-chave:** Cromatina, cultivo tridimensional, maturação nuclear, metáfase II.

## ABSTRACT

### SUMMARY

The success of in vitro embryo production is directly linked to the quality of the oocytes and the conditions of in vitro culture. In the first stage of production called maturation, which refers to the in vitro culture of immature oocytes, the oocytes are selected and receive stimuli, follicular growth and composition from the medium in which they are inserted for the evolution of meiosis, involving nuclear and cytoplasmic changes essential for fertilization and subsequent embryonic development. However, productivity rates remain unchanged and further studies should be conducted in order to improve the quality of oocytes after the in vitro maturation phase. Thus, this study was conducted with two different experiments with the objective of: 1- Assessing the maturation of bovine oocytes with or without cumulus cells in three-dimensional in vitro culture systems using collagen matrix and comparing the traditional two-dimensional system; 2- Compare the methods of visual evaluation using an inverted microscope and fluorescence microscopy after the oocyte maturation process. The percentage of oocytes in the germinal vesicle was higher in those without cumulus cells. The oocytes with cumulus cells in a three-dimensional culture system showed a lower percentage of oocytes in metaphase I. Additionally, metaphase II rates were higher in those with cumulus cells regardless of the culture system. In addition, the percentage of ruptured oocytes was higher in the cumulus cells in 3D culture compared to the others. Different approaches were used to evaluate the oocyte chromatin post-maturation. In the evaluation by an inverted microscope, the parameters presence of the polar corpuscle and extrusion were evaluated. In general, the cumulus cells in 3D system showed a higher percentage of oocytes with polar body extrusion. The parameters analyzed germinal vesicle (fluorescence microscopy) versus absence of polar corpuscle (inverted microscope) and metaphase II (fluorescence microscopy) versus presence of polar corpuscle (inverted microscope) were compared between the approaches used: fluorescence microscopy versus inverted microscope. In general, the percentage of oocytes in the germinal vesicle (fluorescence microscopy) was lower compared to the proportion of oocytes observed with the absence of a polar corpuscle (inverted microscope). On the other hand, the percentage of oocytes in metaphase II (fluorescence microscopy) was higher than those identified with the presence of a polar corpuscle (inverted microscope). In summary, considering the results obtained through the analysis of fluorescence microscopy (elective as gold standard), the resumption of meiosis after the in vitro cultivation of oocytes with cumulus cells was similar between the 2D and 3D systems. Within the same evaluated system (2D or 3D), the absence of cumulus cells compromised the resumption of meiosis. In addition, oocytes matured in the 3D system showed a higher occurrence of damage in the pellucid zone.

**Key words:** Chromatin, metaphase II, nuclear maturation, three-dimensional cultivation.

*“Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe?  
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei,  
Ou nada sei.”*

*Almir Sater e Renato Teixeira*



## AGRADECIMENTOS

Agradecer a DEUS por ter me proporcionado uma existência muito abençoada e dirigindo meus passos me deu a oportunidade de poder ter mais esta conquista.

Agradecer aos meus pais (JOSÉ PIRES E DALVA) pelo investimento que fizeram em mim através da educação que proporcionou eu chegar até aqui, além do mais ter a graça de ter –los ao meu lado neste momento.

Agradecer a minha família: DEBORA minha esposa que sempre me serviu de estímulo, exemplo, dedicação e sabedoria; aos meus filhos (JOÃO VITOR E MARCOS PAULO) que me presentearam com o nobre sentimento de um amor incondicional.

A minha avó (NENZINHA) “in memória” que em todos os momentos fez com que eu sempre acreditasse que poderia conquistar tudo que desejasse.

Ao meu irmão (TAYLOR) pelo grande cuidado e preocupação com minha jornada terrena. Obrigado pelo apoio de sempre.

Aos meus padrinhos (JOÃO CRUVINEL E EURÍPEDES) que sempre colocaram prontos para me amparar em momentos difíceis.

Ao meu tio EDSON que foi o pioneiro na família a dar o exemplo de que com sacrifício poderia se titular como doutor, mudando para sempre minha visão de mundo.

Ao meu orientador DR. LUIZ RICARDO GOULART que viabilizou toda minha titulação, primeiro no mestrado e agora no doutorado. Ao longo de toda minha pós-graduação tive a honra de me tornar seu amigo e vivenciar a sua capacidade e competência de tantos pensamentos presente em vários projetos que conduz ao mesmo tempo. Tenho uma grande admiração por você e reconheço em você um ser iluminado que guia muitos por várias estradas do conhecimento. Eu não tenho palavras ou gestos que possa expressar minha eterna gratidão.

A 25ª turma de medicina da UFU (Universidade Federal de Uberlândia) onde tudo começou, representada aqui pelo meu maior amigo ULLISSES PADUA DE MENEZES. Obrigado pela paciência e tolerância com meus erros e acertos com todos vocês. É uma honra ser dessa turma.

A faculdade de medicina da UFU (Universidade Federal de Uberlândia) através de todos meus professores que me deram a oportunidade, após passar por vários degraus de aprendizagem e crescimento, de tornar-me o profissional que hoje sou.

Aos meus ex colegas de departamento de ginecologia e obstetrícia da UFU (Universidade Federal de Uberlândia). Primeiro por serem meus professores, depois por me proporcionar a capacitação em ginecologia e obstetrícia e posteriormente por serem meus companheiros na formação de várias gerações de alunos e residentes. Mesmo abrindo mão da docência quero registrar a minha gratidão por toda a base que sempre me fez crescer.

A minha chefia imediata (KATIA E LUANA) do antigo NASS do qual participei desde sua formação e após abandonar a docência voltei ao seu quadro de médicos. Obrigado pelo apoio nesta conquista.

A minha chefia superior da DIRCS da UFU (Universidade Federal de Uberlândia) (ABADIA DE FÁTIMA ROSA MACEDO) e ao pró-reitor de recursos humano (DR. MARCIO MAGNO COSTA) por me liberarem prontamente para conclusão desta etapa. Muito obrigado.

As pos-doutoras (DRA. KELE AMARAL ALVES e DRA. CARINA DINIZ ROCHA) sem elas nada disso teria acontecido. Obrigado pela paciência e dedicação imensurável.

Aos pesquisadores (DRA. LARISSA PRADO MAIA, DR. MARIO MACHADO MARTINS e DRA. PAULA DE SOUZA SANTOS) por participar ativamente do trabalho com as dosagens das metabolômicas meu agradecimento.

Ao Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica UFU (Universidade Federal de Uberlândia) por viabilizar esta pesquisa.

Ao Programa de pós-graduação em ciências da saúde faculdade de medicina da UFU (Universidade Federal de Uberlândia) pela oportunidade e tolerância com minha pesquisa.

Acabei a tempo rsrs.

## SUMÁRIO

1.	CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	11
2.	Introdução.....	11
3.	Revisão de Literatura.....	12
4.	Referências.....	19
5.	CAPÍTULO 2.....	24
6.	Introdução.....	26
7.	Metodologia.....	28
8.	Resultados.....	30
9.	Discussão.....	30
10.	Conclusão.....	32
11.	Referências.....	33
11.	CAPÍTULO 3.....	40
12.	Introdução.....	42
13.	Material e Métodos.....	43
14.	Resultados.....	44
15.	Discussão.....	47
16.	Referências.....	50

## LISTA DE FIGURAS

## CAPÍTULO 1

FIGURA 1	Heatmap with the main metabolites identified after <i>in vitro</i> maturation of bovine oocytes in conventional (2D) or collagen matrix (3D) cultures in the presence (CC) or absence (SC) of cumulus cells.....	41
----------	--	----

## LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO 2

- TABELA 1 - Chromatin configuration and extrusion rate after *in vitro* maturation of bovine oocytes in conventional (2D) or matrix membrane associated (3D) culture systems..... 38
- TABELA 2 - Logistic regression coefficients and odds ratio for factors associated with metaphase II after maturation *in vitro* bovine oocytes in conventional (2D) or collagen matrix associated (3D) culture systems..... 39
- TABELA 3 - Odds ratio analysis for the type of culture system (conventional - 2D or with collagen membrane - 3D) and the presence or absence of cells from the cumulus on the oocyte rate in metaphase II after *in vitro* maturation..... 40

## CAPÍTULO 3

- TABELA 1 - Percentual de ovócitos bovinos avaliados em microscópio invertido com formação de corpúsculo polar e extrusão após a maturação *in vitro* em sistemas de cultivo convencional (2D) ou associado a matriz de colágeno (3D)..... 48
- TABELA 2 - Percentual de ovócitos bovinos avaliados por microscopia fluorescência com retomada da meiose e extrusão após a maturação *in vitro* em sistemas de cultivo convencional (2D) ou associado a matriz de colágeno (3D)..... 49
- TABELA 3 - Comparação entre as abordagens utilizadas (microscopia fluorescência vs. microscopia invertido) para avaliação da cromatina de ovócitos submetidos a maturação *in vitro* em sistemas de cultivo convencional (2D) ou associado a matriz de colágeno (3D) ..... 50

## CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica que além de acelerar o processo de reprodução animal de alto valor genético, é utilizada como alternativa para casais que enfrentam problemas de fertilidade, além de ser uma excelente ferramenta para preservação do material genético coletado utilizando a vitrificação de gametas e embriões. A PIVE é dividida em três momentos: maturação *in vitro* de ovócitos (MIV); fertilização *in vitro* (FIV); cultivo *in vitro* de embriões (CIV) seguida ou não da inóvulação de embriões. Adicionalmente, é uma biotécnica de pesquisa a biologia e fisiologia do desenvolvimento e é a partir dela que a produção de clones e animais transgênicos é realizada (BERNARDI, 2005).

A utilização da espécie bovina na PIVE ganha destaque nas pesquisas em biotecnologia da reprodução buscando atender as necessidades de melhoramento genético, no setor pecuário, que apresenta grande importância socioeconômica no Brasil (BELETTI, 2013). Além do interesse econômico, há também o interesse científico, para as pesquisas básicas e aplicadas. Os conhecimentos de cada etapa da produção de embriões são essenciais para o seu sucesso. Mesmo com o grande número de pesquisas e o avanço nas metodologias, a taxa de produtividade ainda apresenta um índice de sucesso baixo (30-45%) e o sucesso de implantação de embriões transplantados mais baixo ainda (40-60% dos blastocistos transferidos) (KANE, 2003; RUBIN, 2006).

O sucesso da PIVE está diretamente ligado à qualidade dos ovócitos (SWAIN et al., 2008), aos espermatozoides utilizados na fertilização (HANSEN, 2006) e as condições de cultivo *in vitro* (controle do pH, osmolaridade, temperatura e tensão de CO<sub>2</sub>) (LONERGAN et al., 2008). Na MIV, primeira etapa da produção que se refere à cultura *in vitro* de ovócitos imaturos, os ovócitos provenientes de aspiração *in vivo* ou de ovários oriundos de abatedouros de animais são selecionados e recebem estímulos provenientes do meio no qual estão inseridos para evolução da meiose, envolvendo alterações nucleares e citoplasmáticas essenciais para a fecundação e posterior desenvolvimento embrionário (DADARWAL et al., 2015).

O uso do sistema de cultivo *in vitro* tridimensional (3D) é uma tentativa de representação mais próxima possível do sistema *in vivo*, para recriar o ambiente similar a matriz extracelular do ovário, que pode permitir a modulação do comportamento celular, crescimento, avaliações a resposta e estímulos e a comunicação com células circundantes (DESAI et al., 2010). Diferentes metodologias e matrizes estão sendo usadas para o cultivo de

células e tecidos no sistema tridimensional a fim de obter melhores resultados.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **Ovogênese e Foliculogênese**

A ovogênese é o processo de formação e desenvolvimento dos ovócitos nos animais a partir das células germinativas primordiais (CGP) até a formação do ovócito haploide fecundado (RÜSSE, 1983). Inicia-se durante o desenvolvimento embrionário com a migração das células germinativas primordiais (CGP) do saco vitelínico para a crista gonadal e após sucessivas mitoses, dão origem as ovogônias. Em seguida, as ovogônias realizam a primeira divisão meiótica e originam os ovócitos primários. Este processo é interrompido no estágio de diplóteno na prófase I, permanecendo nesta etapa até a puberdade do animal (FIGUEIREDO et al., 1998; HAFEZ et al., 2004). Concomitante a este processo, ocorre o início da foliculogênese que compreende a diferenciação e migração das células da granulosa para o contorno do ovócito, formando o pool de folículos primordiais. Nos bovinos este processo ocorre por volta dos 130 dias de gestação (FIGUEIREDO et al., 2007).

O folículo é a unidade morfofuncional do ovário, sendo constituído do ovócito circundado pelas células da granulosa e da teca. Possui duas funções: a esteroidogênese (produção e liberação de esteroides e alguns peptídeos) e a gametogênese (promove um ambiente que mantém a viabilidade, crescimento e liberação de um ovócito maturo no processo de ovulação). Durante a foliculogênese, os folículos formados ainda na vida fetal, podem se desenvolver de pré-antrais (primordial, transição, primário e secundário) para antrais (terciário e pré-ovulatório). Em geral, eles se diferenciam entre si pelo número de camadas de células da granulosa (FIGUEIREDO et al., 2007). Hennem e Combelles (2012) afirmam que o folículo é um microambiente para o ovócito, resultando em uma co-

dependência, mas pouco se sabe sobre as influências dos seus componentes na ovogênese. Sabe-se que a foliculogênese é um processo altamente regulado pelas sinalizações autócrina, parácrina e endócrina (GREEN et al., 2016a). Entretanto, ainda não estão esclarecidos os fatores e mecanismos que participam da escolha dos folículos ativados, bem como o que influencia os processos de crescimento, desenvolvimento e diferenciação (ARAÚJO et al., 2014; FIGUEIREDO et al., 2007).

A grande maioria (95%) dos folículos presentes nos ovários se encontra no estágio de primordiais, pois as células da pré-granulosa param de se multiplicar e permanecem em repouso até que haja um estímulo para que voltem a crescer. Com o mecanismo irreversível da ativação folicular, as células da granulosa se tornam cubóides e a proliferação celular é retomada, evoluindo para folículos de transição (uma camada de células da granulosa pavimentosas e cubóides) e primários (uma camada de 11-40 células da granulosa cubóides ao redor do ovócito primário). Portanto, alguns folículos primordiais deixam o *pool* quiescente e continuam o seu desenvolvimento (ARAÚJO et al., 2014; FIGUEIREDO et al., 1999). Aos 210 dias de gestação, encontram-se os folículos secundários com duas ou mais camadas de células da granulosa (FIGUEIREDO et al., 2007). Além disso, há a formação da zona pelúcida (ZP), grânulos corticais dentro do citoplasma do ovócito, início da formação das células da teca e síntese de mRNA no ovócito (ARAÚJO et al., 2014).

Por volta dos 230-250º dias, alguns folículos passam a ser chamados de terciários devida a presença de várias camadas de células da granulosa e da teca e por possuir uma cavidade antral com fluido folicular. Entretanto, os ovócitos presentes nesses folículos ainda se encontram com o núcleo na prófase I (FIGUEIREDO et al., 2007). Em bovinos, o desenvolvimento de folículos antrais ocorre em 2 fases. Na primeira, há a formação do antro com diâmetro médio de 300 µm. Na segunda fase, acontece o recrutamento de folículos com diâmetro entre 2 a 3 mm, o crescimento, a seleção, a dominância de apenas um folículo (pré-



ovulatório) e então a ovulação. Os folículos restantes (99,9%) sofrem atresia ou entram em apoptose (HENNET et al., 2012). O folículo antral, possui em seu antro o fluido folicular que é derivado tanto da corrente sanguínea como também dos componentes secretados pelas células da granulosa, sendo seus constituintes os esteróides e as glicoproteínas (GREEN et al., 2016a). O folículo também é formado pelo o ovócito circundado pelas células do *cumulus* (células da granulosa especializada), formando o complexo-*cumulus*-ovócito (COC), pelas células da granulosa murais que circundam a parte interior do folículo e pela lâmina basal que separa as células da granulosa das células da teca (HENNET et al., 2012).

As células da teca são divididas em externa e interna. A externa é fibrosa, enquanto a interna é mais vascularizada. A interna constitui-se de 3 a 5 camadas de células endócrinas alongadas e secretoras de esteróides. Portanto, a principal função das células da teca é a secreção de esteróides, porém, elas não conseguem sintetizar estrogênios a partir dos seus andrógenos (MAGOFFIN, 2005). Assim, antes da ovulação, na fase de dominância folicular, as células da granulosa desenvolvem a capacidade de converter os derivados dos andrógenos da teca em estrogênios. Essa relação entre as células da teca e da granulosa tem como resultado a produção de estradiol (HATZIRODOS et al., 2015). As células da teca expressam receptores para LH (hormônio luteinizante) e a ligação hormônio/receptor estimula a síntese de substratos androgênicos. As células da granulosa expressam receptores de FSH (hormônio foliculo estimulante) que desempenha um papel importante no desenvolvimento folicular e na regulação da esteroidogênese no ovário. Os hormônios FSH e LH são produzidos na hipófise e chegam aos folículos por meio dos vasos sanguíneos (YOUNG et al., 2010).

A partir do momento em que o folículo se torna responsivo ao LH e FSH e, juntamente com o pico pré-ovulatório de LH durante a puberdade, o ovócito retoma a meiose rompendo a vesícula germinativa e liberando o primeiro corpúsculo polar. Assim, o ovócito secundário é formado, porém, o núcleo para na segunda divisão meiótica (metáfase II) até que

ocorra a fecundação. Após a fecundação pelo espermatozoide, o ovócito retoma a meiose e libera o segundo corpúsculo polar, finalizando a ovogênese com o desenvolvimento do zigoto (MARTINS et al., 2008).

### **Produção In Vitro de Embriões (PIVE)**

A PIVE é uma biotécnica cujo intuito é reproduzir no laboratório o que acontece na natureza e que vem sendo cada vez mais utilizada na pecuária com interesse zootécnico, nas pesquisas para o desenvolvimento da ciência e na reprodução humana. Essa técnica teve início no século XIX, com a primeira FIV observada em uma estrela do mar (HERMANN, 1879), posteriormente adaptada para outras espécies que em sua evolução e desenvolvimento permitiu o nascimento do primeiro bezerro em 1982 (BRACKETT et al., 1982).

A PIVE é composta por 3 etapas: 1- maturação *in vitro* de ovócitos; 2- fertilização *in vitro*; 3- cultivo *in vitro* de embriões e seu sucesso depende diretamente da qualidade dos ovócitos e dos espermatozoides, além das condições ideais de cultivo (LONERGAN et al., 2008; HANSEN, 2006). Quando os embriões alcançam o estágio de blastocisto, eles podem ser transferidos ou criopreservados.

### **Maturação Ovocitária**

A evolução do estágio imaturo de um ovócito primário para estágio de maturação completa, próprio para sofrer fecundação e sustentar o desenvolvimento embrionário inicial, é chamado de competência ovocitária (MINGOTI et al., 2002; SIRARD, 2001). A competência só é alcançada por meio da ação das células do *cumulus*, responsáveis pela produção de aminoácidos, metabólitos e fatores de crescimento que são transportados para o ovócito por meio de junções comunicantes (GILCHRIST et al., 2008) e pela ação do hormônio foliculo estimulante (FSH) que atua nas células do cúmulo e estimula a proliferação dessas células, além da síntese de esteroides e expressão de receptores para hormônio luteinizante (LH) (MARTINS et al., 2008).

A maturação ovocitária ocorre gradualmente e pode ser dividida em: maturação nuclear, caracterizada pela retomada da meiose bloqueada em vesícula germinativa (VG) até alcançar o estágio de metáfase II; maturação citoplasmática, em que ocorre a reorganização da

distribuição das organelas citoplasmáticas; e maturação molecular, na qual ocorre síntese e armazenamento de proteínas e RNAm (ANGUITA et al., 2008; DODE, 2006; GONÇALVES et al., 2008; SIRARD et al., 2006).

A maturação nuclear consiste na produção de um gameta haploide pela meiose da célula germinativa, na qual o núcleo sai do estágio de VG e progride para metáfase II. Essa retomada da meiose ocorre *in vivo* devido ao pico de LH (BETTERIDGE et al., 1989) e *in vitro* o start é dado pela retirada do ovócito do interior do folículo (PINCUS et al., 1935). O estágio de VG é caracterizado por um núcleo esférico e pela cromatina descondensada. Interpreta-se que houve o desbloqueio da meiose quando há a condensação cromossômica e a desintegração da membrana nuclear, além da formação da placa metafásica (LANDIM-ALVARENGA et al., 1999). O desbloqueio da meiose é dependente de ativação pelo fator promotor de maturação (MPF – maturation promoting factor), cuja ação está relacionada à dissolução do nucléolo do envoltório nuclear, à condensação cromossômica e à reorganização microtubular (VERDE et al., 1992).

A maturação citoplasmática ocorre simultaneamente à maturação nuclear e consiste em modificações ultraestruturais das organelas que envolvem alterações morfofisiológicas e dispersão pelo ooplasma, muito bem caracterizado principalmente pela proliferação e redispersão de mitocôndrias. As mitocôndrias exercem papel essencial nos ovócitos, sendo a produção de adenosina trifosfato (ATP), o controle de íons  $Ca^{2+}$ , a redução da homeostase e participação na reação em cadeia da apoptose (DUMOLLARD et al., 2007). No estágio imaturo do ovócito as mitocôndrias são, em sua maioria, esféricas e com poucas cristas (READER et al., 2017), além de apresentarem localização periférica. Após a maturação ovocitária, a forma e volume mitocondrial são alterados e prevalecem mitocôndrias no formato de capuz (HYTTEL, 2011) com distribuição por todo o citoplasma (HYTTEL et al., 1986).

## **Fecundação**

Uma vez finalizada a maturação ovocitária, o ovócito está apto para ser fecundado por um espermatozoide que deve possuir motilidade e vigor adequados para fixação espermática na zona pelúcida e fusão das membranas plasmáticas de ambas células envolvidas no processo (HAFEZ 2004). A capacitação espermática é induzida devido à presença de glicosaminoglicanos que desencadeiam uma cascata bioquímica que resulta no aumento da

motilidade espermática e inicia o processo de reação acrossômica, o que permite que receptores presentes na ZP possam reconhecer o espermatozoide e permitir a fecundação (DODE et al., 2002).

Quando o espermatozoide capacitado se aproxima do ovócito ele se liga à receptores localizados na zona pelúcida, chamados de ZP1, ZP2, e ZP3, que são responsáveis por reconhecer os espermatozoides e também pela ativação da reação acrossômica, onde o espermatozoide libera, por excitose, o conteúdo do acrossoma que é composto por proteínas que são responsáveis pela digestão da ZP (hialuronidase e acrosina), para poder assim penetrar a ZP e fecundar o ovócito (GONÇALVES, 2008). Após a fecundação uma série de eventos acontecem para que não haja poliespermia, mas sim a formação de um zigoto pronto para iniciar o desenvolvimento embrionário: finalização da meiose do ovócito com a extrusão do segundo corpúsculo polar; despolarização da membrana plasmática; excitose dos grânulos corticais; aumento das oscilações intracelulares de cálcio; fusão dos pró-núcleos feminino e masculino; formação de um núcleo diploide apto a originar um novo indivíduo.

### **Desenvolvimento Embrionário Inicial**

Após a formação do zigoto, sucessivas divisões mitóticas acontecem dando início ao desenvolvimento multicelular do indivíduo, em que cada célula é chamada de blastômero e cada divisão de clivagem. A atividade transcricional do embrião é ativada e progressivamente aumentada à medida que o material produzido e estocado pelo ovócito é consumido nesse estágio de desenvolvimento inicial (WATSON et al., 2001). Também à medida que as divisões celulares aumentam, os estágios mudam, em que o embrião ao chegar a mórula compacta inicia o processo de diferenciação celular que dará origem a duas linhagens iniciais: células do trofoblasto e do embrioblasto. Após a compactação dos blastômeros, existe um acúmulo de fluido dentro do embrião que dá origem à blastocele. As células do trofoblasto darão origem então à placenta e as células do embrioblasto formarão o botão embrionário que se diferenciará nos três folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma durante o processo de gastrulação (HAFEZ 2004).

### **Produção de EROS na PIVE**

A cadeia respiratória mitocondrial, ao produzir ATP, utiliza oxigênio como aceptor final de elétrons que leva a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) – ânions superóxidos ( $O_2^-$ ); peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); hidroxilas ( $OH^-$ ). Esses radicais, em excesso, causam estresse oxidativo nas células, danos no DNA, RNA, proteínas e nas funções mitocondriais (COMPORTI, 1989), inibem a fecundação do ovócito pelo espermatozoide (AITKEN et al., 1993), além de levar à morte celular (GUERIN et al., 2001). A produção de EROS intracelular é potencializada tanto pelo processo de produção *in vitro* de embriões através da tensão de  $O_2$  e da manipulação excessiva que a técnica requer, quanto pelo processo de criopreservação por meio do estresse osmótico e retomada das reações de oxirredução no reaquecimento das estruturas.

### **Sistema de Cultivo 3D**

O sistema de cultivo 3D foi desenvolvido para manter a morfologia do ovócito, tentando recriar um ambiente similar à matriz extracelular do ovário *in vitro*. O objetivo é reduzir a tensão que o complexo granulosa-ovócito sofre quando cultivado em sistema convencional 2D com contato direto na placa (TELFER et al., 2012). Por se tratar de uma biotécnia relativamente nova, há grande variação nas formas de cultivar os ovócitos, seja apenas um ou vários ovócitos encapsulados em matrizes, co-cultivados com outros tipos celulares ou ovócitos em suspensão por agitação contínua. Além disso, diferentes tipos de matrizes têm sido testadas a fim de se estabelecer a melhor condição para o desenvolvimento dos ovócitos. As matrizes são divididas conforme sua origem em: matrizes com componentes naturais (alginato, misturas de alginato e fibrina e matrigel) ou sintéticos (hidrogel de polietileno glicol – PEG e nanopartículas) (GREEN et al., 2016b).

### **Técnicas para Avaliação da Eficiência da Maturação Ovocitária In Vitro**

Depois de cultivar os ovócitos é necessário avaliar a eficiência pós-cultivo, pois podem ocorrer alterações que causam efeitos positivos e/ou negativos na qualidade do

fóliculo. Para isso existem várias técnicas que podem ser utilizadas como a avaliação morfológica, expressão gênica (CELESTINO et al., 2011), dosagem hormonal. (SILVA et al., 2013) e a microscopia de fluorescência (ROSSETTO et al., 2013). A expressão gênica permite compreender melhor os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e degeneração folicular por meio de produtos de alguns genes específicos como IGFs, EGF,  $\beta$ -Ativina entre outros (CELESTINO et al., 2011). A dosagem de hormônios esteroides é importante para analisar as alterações nos níveis de esteroides intrafoliculares que podem determinar o destino folicular. Por meio da microscopia de fluorescência é possível avaliar a viabilidade celular empregando marcadores específicos. Para o estudo tanto de foliculos pré-antrais como também de ovócitos é comum utilizar dois marcadores fluorescentes simultaneamente: a calceína AM (excita a 494 nm e emite a 517 nm) e o etídio homodímero-1 (excita a 528 nm e emite a 617 nm). A calceína confere a marcação verde após ser clivada por enzimas esterases em células vivas. Já o etídio homodímero-1 marca de vermelho as células que possuem a integridade de membrana plasmática (HAUGLAND et al., 1994; LOPES et al., 2009). Além da viabilidade celular, é possível avaliar a configuração da cromatina de ovócitos por meio do marcador Hoechst 33342 ou o DAPI (4',6-Diamidina-2'-fenilindol di-hidrocloro, excita a 360nm e emite a 460nm) que se intercalam entre as bases nitrogenadas do DNA produzindo uma fluorescência azul (NUTTINCK et al., 1993; SILVA et al., 2015).

### 3 REFERÊNCIAS

ANGUITA, B.; PARAMIO, M.T.; JIMENEZ-MACEDO, A.R.; MORATÓ, R.; MOGAS, T.; IZQUIERDO, D. Total RNA and protein content, Cyclin B1 expression and developmental competence of prepubertal goat oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.103, p.290-303, 2008.

ARAÚJO, V. R. et al. Effect of Bone Morphogenetic Protein-7 ( BMP-7 ) on in vitro survival of caprine preantral follicles. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 305–310, 2010.

- ARAÚJO, V. R. et al. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 12, p. 78, 2014
- BELETTI, M. E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 92-96, 2013.
- BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C.; STUBBING, R.B., XU, K.P.; KING, W. A. Potencial genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p. 87-98, 1989.
- BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F. AND DRESSEL, M.A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**. v.27, n.1, p.147-158, 1982.
- CELESTINO, J. J. H. et al. Steady-state level of epidermal growth factor ( EGF ) mRNA and effect of EGF on in vitro culture of caprine preantral follicles. **Cell Tissue Res**, v. 344, p. 539–550, 2011.
- COMPORTI, M. Three models of free radical induced cell injury. **Chemistry and Biology Interact**, v.72, p.1-56, 1989.
- DESAI, N. et al. Three-dimensional in vitro follicle growth: overview of culture models, biomaterials, design parameters and future directions. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 119, 2010.
- DODE, M.A.N. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. In: XX Reunião anual da sociedade brasileira de tecnologia de embriões. **Anais: Acta Scientiae Veterinariae, Araxá: Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, p.115 – 130, 2006.
- DUMOLLARD, R.; DUCHEN, M.; CARROLL, J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 77; p. 21–49, 2007.
- FIGUEIREDO, J. R. et al. Utilização do potencial de oócitos imaturos inclusos em folículos pré-antrais na reprodução de mamíferos. **Ciencia Animal**, v. 8, n. 1, p. 23–29, 1998.
- FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, J. R. V; RODRIGUES, A. P. R. Estado atual da biotecnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA). **Ciencia Animal**, v. 9, n. 1, p. 11–25, 1999.
- FIGUEIREDO, J. R. et al. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 143-152, 2007.

- GILCHRIST, R.B.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v. 14, p. 159-177, 2008
- GONÇALVES, P. B. D.; JOSÉ RICARDO DE FIGUEIREDO; VICENTE JOSÉ DE FIGUEIRÊDO FREITAS. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008.
- GREEN, L. J.; SHIKANOV, A. *In vitro* culture methods of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 229–238, 2016.
- GUERIN, P.; MOUATASSIM, S.E.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, p.175-189, 2001.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S.; BARNABE, R. C. **Reprodução animal**. [s.l.] Manole, 2004.
- HATZIRODOS, N. et al. Transcriptome comparisons identify new cell markers for theca interna and granulosa cells from small and large antral ovarian follicles. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–13, 2015.
- HANSEN, P. J. Realizing the promise of IVF in cattle – an overview. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 119-125, 2006.
- HAUGLAND, R. P.; MACCOUBREY, I. C.; MOORE, P. L. Dual-Fluorescence Cell Viability Assay Using Ethidium Homodimer and Calcein Am. **US patents**, 1994.
- HENNET, M. L.; COMBELLES, C. M. H. The antral follicle: A microenvironment for oocyte differentiation. **International Journal of Developmental Biology**, v. 56, n. 10–12, p. 819–831, 2012.
- HERMANN, F. A more extensive treatment appeared in idem, Recherches sur la fécondation et le commencement de l'hog nie chez divers animaux. **Mémoires de la société de physique et d'histoire naturelle de Genève**, v. 26, p. 92-397, 1879.
- HYTTEL, P., XU, K. P., SMITH, S., and GREVE, T. Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, n. 2, p. 615–625, 1986.
- HYTTEL, P. Electron microscopy of mammalian oocyte development, maturation and fertilization. In oocyte maturation and fertilization: a long history for a short event. **Bentham Science Publishers**, Oak Park, USA, p. 1-37, 2011.
- KANE, M.T. A review of *in vitro* gamete maturation and embryo culture and potencial impact



- on future animal biotechnology. **Animal Reproduction Science**, v. 79, n. 3-4, p. 171-190, 2003.
- LANDIM-ALVARENGA, F. C.; CHOI, Y. H. In vitro maturation of equine oocytes without hormones. **Theriogenology**. v.51, p.383, 1999.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro* produced embryo-Dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, p.17-22, 2008.
- LOPES, C. A. P. et al. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time. **Animal Reproduction Science**, v. 115, n. 1-4, p. 201-214, 2009.
- MAGOFFIN, D. A. Ovarian theca cell. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 7, p. 1344-1349, 2005.
- MARTINS, F. S. et al. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 1, p. 36-49, 2008.
- MINGOTI, G. Z. ; GARCIA, J. M. ; ROSA E SILVA, A. A. M. . Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured *in vitro* with BSA and different concentrations of steroids.. **Animal Reproduction Science**, v.69, p.175-186, 2002.
- NUTTINCK, F. et al. Characterization of *in Vitro* Growth of Bovine Preantral Follicles : a Preliminary Study. **Theriogenology**, v. 39, p. 811-821, 1993.
- PINCUS, G.; ENZMANN, E. The comparative behavior of mammalian eggs *in vitro* and in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**. v.62, p.665-675, 1935.
- READER, K.L.; STANTON, J.A.L.; JUENGEL, J.L. The Role of Oocyte Organelles in Determining Developmental Competence. **Biology**, v. 6, n. 3, p.35, 2017.
- ROSSETTO, R. et al. Effect of medium composition on the *in vitro* culture of bovine preantral follicles: morphology and viability do not guarantee functionality. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 21, n. 2, p. 125-8, 2013
- RUBIN, K.C. P. **Particularidades reprodutivas da raça Nelore na produção in vitro de embriões (PIVE)**. 2006. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2006.
- SILVA, C. M. G. et al. Research in Veterinary Science The effects of epidermal growth factor ( EGF ) on the *in vitro* development of isolated goat secondary follicles and the relative mRNA expression of EGF , EGF-R , FSH-R and P450 aromatase in cultured follicles. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 453-461, 2013.

SILVA, C. M. G. et al. Activin-A promotes the development of goat isolated secondary follicles *in vitro*. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 23, n. 1, p. 41–52, 2015a.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v.55, p.1241-1254, 2001.

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

TELFER, E. E.; MCLAUGHLIN, M. Strategies to support human oocyte development *in vitro*. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 56, n. 10–12, p. 901–907, 2012.

VERDE, F.; DOGTEROM, M.; STELZER, E.; KARSENTI, E.; LEIBLER, S. Control of microtubule dynamics and length by cyclin A-dependent and cyclin B-dependent kinases in *Xenopus* eggs extracts. **The Journal of Cell Biology**. v.118, p.1097-1108, 1992.

WATSON, A. J.; BARCROFT, L. C. Regulation of blastocyst formation. **Frontiers in Bioscience**, v. 6, p. 708-730, 2001.

**CAPÍTULO 2 - Effect of three-dimensional collagen membrane system on *in vitro* maturation of bovine oocytes**

Manuscrito formatado de acordo com as normas do periódico Human Reproduction Archives

**Effect of three-dimensional collagen membrane system on *in vitro* maturation of bovine oocytes**

José Pires Ribeiro Júnior<sup>1</sup>, Carina Diniz Rocha<sup>2</sup>, João Vitor Gomes Pires<sup>3</sup>, Kele Amaral Alves<sup>4</sup>, Luiz Ricardo Goulart<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Nanobiotechnology Laboratory, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

<sup>2</sup> Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

<sup>3</sup> Under graduated student of Medicine School, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

<sup>4</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Medicine School of Ribeirão Preto, São Paulo University, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

**Abstract**

**Objectives:** Assess the effects of the use of collagen membrane on the maturation process of bovine oocytes. **Methodology:** Bovine oocytes with or without cumulus cells were cultured in maturation medium for 24 hours in the conventional system (2D), using central well plates. In the three-dimensional (3D) system, the oocytes were positioned in the collagen membrane and matured for the same period. The morphological evaluation was carried out with the parameters of maturation: presence or absence of the first polar corpuscle were observed and classified as germinal vesicle (VG), meiosis I (MI) and meiosis II (MII). **Results:** The proportion of oocytes in VG was higher in treatments without cumulus cells. The treatment with cumulus cells in 3D culture showed lower percentage of oocytes in MI when compared to the treatment 2D without cumulus cells. The rates of MII were higher in the treatments with cumulus cells, independent of the culture system. In addition, higher occurrence of damage in the pellucid zone was higher in the treatment with cumulus cells 3D compared to the others. In general, oocytes with the presence of cumulus cells have ~1.7 times more chance of reaching MII after *in vitro* maturation than those matured without cells. **Conclusion:** the presence of the cells in the cumulus is essential for the maturation process of bovine oocytes; the three-dimensional collagen membrane culture system is favorable for the maturation process of bovine oocytes.

**Key words:** cumulus cells, *in vitro* maturation, meiosis, tridimensional culture.

## Resumo

Objetivos: Avaliar os efeitos do uso de membrana de colágeno no processo de maturação de oócitos bovinos. Metodologia: Oócitos bovinos com ou sem células do *cúmulos* foram cultivados em meio de maturação por 24 horas no sistema convencional (2D), utilizando placas de poços centrais. No sistema tridimensional (3D), os oócitos foram posicionados na membrana de colágeno e maturados pelo mesmo período. A avaliação morfológica foi realizada com os parâmetros de maturação: a presença ou ausência do primeiro corpúsculo polar foi observada e classificada como vesícula germinativa (VG), meiose I (MI) e meiose II (MII). Resultados: A proporção de oócitos em O VG foi maior nos tratamentos sem células *cúmulos*. O tratamento com células do *cúmulos* em cultura 3D apresentou menor porcentagem de oócitos no IM quando comparado ao tratamento 2D sem células do *cúmulos*. As taxas de MII foram maiores nos tratamentos com células *cúmulos*, independente do sistema de cultivo. Além disso, a porcentagem de oócitos extrusados foi maior no tratamento com células do *cúmulos* 3D em relação aos demais. Em geral, oócitos com a presença de células do *cúmulos* têm ~ 1,7 vezes mais chance de atingir MII após a maturação *in vitro* do que aqueles maturados sem células. Conclusão: a presença de células no *cúmulos* é essencial para o processo de maturação de oócitos bovinos; o sistema tridimensional de cultura de membrana de colágeno é favorável ao processo de maturação de oócitos bovinos.

Palavras-chave: células *cúmulos*, maturação *in vitro*, meiose, cultura tridimensional.

## Introduction

The production of embryos *in vitro* (IVP) is of great scientific importance to meet the needs of women facing infertility and could be associated with increased reproductive efficiency of farm animals. However, research using human material faces difficulties due to the scarcity of material and ethical barriers. Thus, the use of animals as experimental models<sup>1-2</sup> has been proposed to improve the techniques applied in human reproduction clinics. In this context, the bovine species stands out for presenting similarities with antral and preantral folliculogenesis of women, and the double aptitude to take advantage of the genetic potential of the species in the development of livestock<sup>3</sup>.

The IVP techniques comprise three stages: maturation, fertilization and *in vitro* cultivation, which must take place synchronously for the PIVE process to have good results. The evolution from the immature stage of a primary oocyte to the stage of complete

maturation proper to undergo fertilization and sustain the initial embryonic development is called oocyte competence<sup>4-5</sup>. The competence is only achieved through the action of cumulus cells, responsible for the production of amino acids, metabolites and growth factors that are transported to the oocyte through communicating junctions<sup>6</sup> and the action of follicle stimulating hormone (FSH) that acts on the cumulus cells and stimulates the proliferation of these cells, in addition to the synthesis of steroids and expression of receptors for LH<sup>7</sup>. Nuclear and cytoplasmic oocyte maturation is one of the most important and limiting stages of the process, since it comprises the events for the oocyte to express its maximum development after fertilization<sup>8</sup>. Among these events are cascades of activation and inhibition of enzymes, hormones and growth factors<sup>9</sup>.

Usually, IVM occurs in culture plates with deposition of groups of *cumulus* oocytes complexes (COCs) in micro drops of maturation medium, in which the COCs are in contact with the base of the plate. This traditional culture system, also called two-dimensional (2D), may present disadvantages, because the oocytes may adhere to the plate surface and impair the development of this region, preventing its contact with the nutrients of the medium, besides modifying the natural morphology of the oocyte structure, which is three-dimensional.

Only 25 to 40% of oocytes submitted to the maturation process (MIV) are competent for development to the blastocyst stage, which becomes an obstacle for *in vitro* embryo production<sup>10</sup>. Among the factors that influence this stage we can mention the high oxygen tension associated with light interference, temperature and absence of antioxidants naturally present in the follicular fluid<sup>11</sup>. Moreover, although the IVP technique is consolidated, the quality of embryos produced *in vitro* is still lower than those produced *in vivo*, with production rates of the usual protocols not exceeding 40%. Therefore, it is important to seek more and more tools to increase the results, so that the embryos produced *in vitro* have the potential for survival close to those produced *in vivo*<sup>12</sup>.

An alternative to traditional cultivation, are three-dimensional cultivation systems, which are increasingly being tested and applied in cell culture as an alternative to increasing the development of *in vitro* culture structures. A three-dimensional cultivation system consisting of collagen membrane that mimics the extracellular matrix environment has been used with positive results in cell associations and in maintaining cell viability<sup>13</sup>.

Thus, this study aims to evaluate the effects of the use of collagen membrane in the *in vitro* maturation process of bovine oocytes.

## **Methodology**

### Ovaries collection

The present study was submitted and exempted from authorization by the Animal Use Ethics Committee (protocol #A005/18). Ovaries of mestizo females (*Bos taurus* × *Bos indicus*), aged between 24 and 48 months, were collected at a local slaughterhouse. Then, the ovaries were transported to the laboratory in a Thermos bottle (temperature between 35-37°C) in a maximum period of 3 hours.

### Follicular aspiration to obtain the cumulus-oocyte complexes (CCOs)

In the laboratory, the ovaries were kept in a solution containing saline solution enriched with 1% fetal bovine serum and antibiotic (amikacin) at 38°C. Later, the CCOs were obtained from ovarian follicles (3 to 8 mm in diameter) by puncture with the aid of a needle coupled with a 10 mL syringe. The follicular fluid obtained was deposited in 15 mL conical tubes (Oosafe® SparMED, Denmark), left to rest in a water bath (38°C for 10 to 20 minutes) until sedimentation and then transferred to Petri dishes (100 × 20 mm; Oosafe®) and evaluated under stereoscopic (15×; Nikon®, SMZ-800, Japan) for tracing of CCOs.

### Experimental design

The selected CCOs had a standardized cytoplasmic morphology (Grade I and II) according to the coverage of cells in the cumulus (with or without cells in the cumulus). Then the oocytes were washed in TCM-199 HEPES medium supplemented with bovine fetal serum (10.0 %), pyruvate (0.11 mg/mL) and amikacin (83.0 mg/mL) and distributed in the following treatments: CC-2D, oocytes (n = 150) with cumulus submitted to conventional *in vitro* maturation (IVM) (two-dimensional system - 2D); CC-3D, oocytes (n = 133) with cumulus submitted to IVM with collagen membrane (three-dimensional system - 3D); SC-2D, oocytes (n = 150) without cumulus submitted to conventional MIV (2D); and SC-3D, oocytes (n = 147) without cumulus submitted to MIV in medium with collagen membrane. A total of 6 replicates were performed per treatment.

### In vitro Maturation (IVM)

In the conventional system (2D), the oocytes were matured in groups using central well plates with approximately 1000  $\mu\text{L}$  of maturation medium. In the three-dimensional (3D) system, the oocytes were positioned on the collagen membrane and matured in drops of 1000 $\mu\text{L}$  of the same medium. The medium used in both the 2D and 3D systems was TCM-199 supplemented. The IVM was performed in an incubator (Thermo Scientific Forma®, Series II 3110, USA) for 24 hours with 5%  $\text{CO}_2$  in saturated humidity at 38.5 °C.

### Morphological analysis of meiotic recovery after MIV -

The evaluation of the resumption of meiosis was performed after the removal of the cumulus cell. Briefly, the CCOs were washed in a 300  $\mu\text{L}$  drop of hyaluronidase (Fertipo®, YYA001, Belgium) for 60 seconds. They were then pipetted successively with micropipettes (Streeper Denupet, Vitromed® GmbH, Canada) of different calibers (300  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$ , and 135  $\mu\text{m}$ ) until the cells were completely removed.

The morphological evaluation of the resumption of meiosis was performed by a single evaluator. In this evaluation the parameters of maturation with presence or absence of the first polar corpuscle were observed and classified as germinal vesicle (VG), meiosis I (MI) and meiosis II (MII) through an inverted microscope with phase contrast (Nikon® TE 2000, Japan). In addition, oocytes with rupture of the pellucid zone called extrusion were evaluated..

### Metabolomics analysis

The maturation media (D0 and D1) from all experimental groups were collected and frozen for metabolic analysis. For the extraction of metabolites 100  $\mu\text{L}$  of sample with 1000  $\mu\text{L}$  of methanol spectroscopic grade in eppendorf of 1.5 mL was added. This mixture was incubated for 4 hours in ultrafreezer (-80°C). In sequence centrifuged for 15 min to 13000g and the supernatant transferred to another eppendorf of 1.5 mL, which was packed in vacuum concentrator for 30 minutes and lyophilized. The material was stored in ultrafreezer (-80°C) until the moment of the analyses.

In mass spectrometry analyses the samples were suspended in 500  $\mu\text{L}$  of methanol spectroscopic grade and filtered in a 0.22 micrometer pore tip filter.

### Statistical analysis



The statistical analysis was performed using Sigma Plot version 11 (Systat Software Inc., USA). The chromatin configuration between treatments was evaluated by Fisher's chi-square or exact tests. The logistic regression analysis evaluated the association of the cumulus cells and collagen matrix (independent variables) on the presence of the first polar corpuscle and metaphase II (dependent variables). The data were presented as percentages and considered significant when  $P < 0.05$ .

## Results

A total of 554 oocytes were submitted to maturation in vitro and later evaluated for chromatin and extrusion configuration (Table 1). The percentage of oocytes in VG was higher ( $P < 0.05$ ) in treatments without cumulus cells (SC-2D and SC-3D) than those with cells (CC-2D and CC-3D). The CC-3D treatment presented lower ( $P < 0.05$ ) percentage of oocytes in MI when compared to SC-2D treatment. MII rates were higher ( $P < 0.05$ ) in CC-2D and CC-3D treatments compared to SC-2D and SC-3D treatments. In addition, the percentage of rupture of the pellucid zone oocytes was higher ( $P < 0.05$ ) in the CC-3D treatment compared to the others (CC-2D, SC-2D and SC-3D).

Logistic regression was performed to evaluate the influence of the culture system (conventional - 2D or with collagen membrane - 3D) and the presence or absence of cells from the cumulus (with or without) on the MII rate (Table 2). In general, oocytes with presence of cumulus cells have ~1.7 times more chances ( $P < 0.001$ ) of reaching MII after MIV than those matured without cells.

The odds ratio analysis was performed among the treatments and complemented the logistic regression results (Table 3). In summary, the culture system (2D or 3D) did not influence ( $P > 0.05$ ) MII rates.

A total of 66 compounds were identified, however, only 3 showed differences between treatments (Figure 1).

## Discussão

The present study evaluated the effect of the absence of cells from the *cumulus* and the adoption of the collagen membrane (tridimensional system) in the maturation process of bovine oocytes. One of the challenges of reproductive medicine and biology is to understand the nature of molecular and cellular processes that control oocyte competence for

development. This competence, acquired through maturation, is a complex process that comprises nuclear and cytoplasmic maturation and involves a deep interaction between oocyte and cumulus oophorus cells. *Cumulus* oophorus cells are keys to paracrine and endocrine signaling and maturation<sup>14</sup>. Variations *in vitro* maturation systems have been tested in order to preserve these connections and privilege the contact of the oocyte with the substrate. Among the variations we can mention the use of matrices and membranes that enable the maintenance of the original cell structure, unlike the flattening observed in traditional (two-dimensional) cultivation systems.

The absence of cells from the cumulus elevated the proportion of oocytes in the germinal vesicle stage. On the other hand, the presence of cells from the cumulus has benefited oocyte maturation in both culture systems (2D and 3D). The follicular microenvironment of the ovary and the maternal signs, mediated mainly by the cumulus cells, are responsible for supporting oocyte growth, its development and the gradual acquisition of developmental skills<sup>15</sup>. Cumulus cells play a critical role during meiotic maturation *in vitro*. Previous studies have shown that naked human oocytes exhibit accelerated resurgence of meiosis *in vitro*, a deficiency in cytoplasmic ability to maintain metaphase characteristics while meiosis progresses, a propensity to activate spontaneously after interruption of meiosis, and a lack of coordination between nuclear and cytoplasmic maturation<sup>16</sup>. In addition, the cleavage rate was reduced in a study with naked bovine oocytes<sup>17</sup>. The absence of cells from the cumulus during IVM also affects lipid metabolism of oocytes, leading to sub-optimal cytoplasmic maturation and consequently reducing their competence for development<sup>18</sup>.

In this study, the regression and odds ratio analyses proved the beneficial action of the cells in the cumulus during the oocyte maturation process. The co-cultivation with monolayer of cells from the cumulus partially restored the development potential of naked oocytes, and favored the competence of oocytes that had only the irradiated coronary<sup>19</sup>. Many centers of human assisted reproduction have adopted oocyte denudation for the purpose of facilitating the action of promoting factors in the maturation medium. In fact, this procedure often results in oocyte impairment<sup>20</sup>. The cells in the cumulus have promising capabilities to influence the development of oocytes by releasing secretory factors with properties of attraction to chemotaxis, prolonging the survival of oocytes and accelerating the maturation of oocytes by gene activation, in addition to improving rates of implantation and pregnancy in ICSI<sup>14, 21-23</sup>.

Oocytes were positively affected by maturation in the three-dimensional system due to the maintenance of their original shape. The difference between *in vitro* maturation and the *in vivo* environment may arise from the extent of communication between somatic cells and oocytes. Several studies have reported that during the pre-maturation and maturation processes there is a loss of association between oocytes and cumulus cells<sup>24-25</sup>. Oocyte cumulus complexes adhere to the Petri dish in two-dimensional (2D) culture and somatic cells spread and migrate away from the oocyte. In fact, this effect alters the three-dimensional (3D) structure of COCs, thus interrupting cell-cell interactions. Providing an appropriate environment for COC maturation in three dimensions is not easy. The density and mechanical properties of the matrix can influence *in vitro* cellular behavior<sup>26-27</sup>. Studies using oocytes from mice and humans with 3D culture in the pre-maturation stage obtained higher cleavage rates than in two-dimensional culture in both species<sup>28</sup>. Additionally, naked oocytes from mice co-cultivated with cumulus cells in three-dimensional system showed cleavage rates and blastocysts similar to COCs cultivated in microdrops<sup>29</sup>. The three-dimensional system by magnetic levitation was used in the cultivation of bovine pre-antral follicles and favored the included oocytes to complete meiosis I<sup>30</sup>.

The use of collagen membranes in three-dimensional cultivation can mimic the ovarian extra cellular matrix since this structure provides mechanical support and regulates several cellular activities<sup>31-32</sup> and benefits oocyte maturation. The first study using membranes in cell culture reported results of prolonged cell viability and maintenance of cell functional characteristics<sup>33</sup>. Three-dimensional cultures in basement membrane gels have been successfully used for over 20 years with a variety of cell types and explant organs. The usefulness of this culture system is based on how cells and explants respond<sup>34</sup>.

## **Conclusion**

Thus, the results of this study allow us to conclude that 1) the presence of the cells in the cumulus is essential for the maturation process of bovine oocytes; 2) the three-dimensional collagen membrane culture system is favorable to the maturation process of bovine oocytes. Further studies are needed to enable the use of membranes in the *in vitro* production process of bovine embryos.

## References

- 1- Araújo VR, Figueiredo J R, Gastal EL. *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. Rep Biol and Endocrin: RB&E. 2014; 12:78.
- 2- Baerwald AR. Human antral folliculogenesis : what we have learned from the bovine and equine models. Anim Rep. 2009; 6 (1): 20–29.
- 3- Beletti M E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. Rev Bras de Rep Anim. 2013; 37 (2): 92-96.
- 4- Mingoti G Z, Garcia JM, Rosa e Silva A A M. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured *in vitro* with BSA and different concentrations of steroids. Anim Rep Sci. 2002; 69:175-186.
- 5- Sirard MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. Theriogenology.2001; 55: 1241-1254.
- 6- Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of *cumulus* cell function and oocyte quality. Hum Rep Upd. 2008; 14: 159-177.
- 7- Martins F S, Silva JRV, Rodrigues APR, Figueiredo JR. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. Rev Bras de Rep Anim. 2008; 32( 1): 36–49.
- 8- Crocomo LF, Marques FWC, Sudano MJ, Paschoal DM, Landim-Alvarenga FC, Bicudo S D. Effect of roscovitine and cycloheximide on ultrastructure of sheep oocytes. Sm Rum Res.2013; 109: 156-162.
- 9- Castro SV, Carvalho AA, Silva CMG, Faustino LR, Figueiredo JR, Rodrigues APR. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e ovócitos. Ac Sci Vet. 2011; 39 (2): 1-17.
- 10- Farin CE, Rodriguez KF, Alexander JE, Hockney JE, Herricke JR, Kennedy-Stoskopfd S. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. Anim Rep Sci.2007; 98 (1-2): 97-112.
- 11- Wang T, Lessman C.A. Isoforms of soluble  $\alpha$ -tubulin in oocytes and brain of the frog (genus *Rana*): changes during oocyte maturation. Cel and Mol Life Sci. 2002; 59: 2216-2223.

12- Rômany LRG, João HMV. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal; 2019; Gramado RS.

13- Krause S, Maffini MV, Soto AM, Sonnenschein C A. Novel 3D *In Vitro* Culture Model to Study Stromal–Epithelial Interactions in the Mammary Gland. Tiss Eng. 2008; 14 (3).

14- Bhadarka HK, Patel NH, Patel NH, Patel M, Patel KB, Sodagar NR. Impact of embryo  
co

22- Guo J, Zhang T, Guo Y, Sun T, Li H, Zhang X, et al. Oocyte stage

32- Venugopal JR, Zhang Y, Ramakrishna S. *In Vitro* Culture of Human Dermal Fibroblasts on Electrospun Polycaprolactone Collagen Nanofibrous Membrane. *Artif Org.* 2006; 30 (6): 440-446.

33- Michalopoulos G, Pitot HC. Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes: Morphological and biochemical observations. *Exp Cell Res*, 1975;94 (1): 70-78.

34- Benton G, George J, Kleinman HK, Arnaoutova IP. Advancing Science and Technology Via 3D Culture on Basement Membrane Matrix. *J of Cell Phys.* 2009; 22: 18-25.

Table 1. Chromatin configuration and extrusion rate after *in vitro* maturation of bovine oocytes in conventional (2D) or collagen membrane associated (3D) culture systems.

‡Treatments	Chromatin configuration (%)			Extruded (%)
	VG	MI	MII	
CC-2D	32,6 (47/144) <sup>A</sup>	7,6 (11/144) <sup>AB</sup>	59,0 (85/144) <sup>B</sup>	0,7 (1/144) <sup>A</sup>
CC-3D	27,0 (34/126) <sup>A</sup>	4,0 (5/126) <sup>A</sup>	60,3 (76/126) <sup>B</sup>	8,7 (11/126) <sup>B</sup>
SC-2D	43,8 (64/146) <sup>B</sup>	10,9 (16/146) <sup>B</sup>	44,5 (65/146) <sup>A</sup>	0,6 (1/146) <sup>A</sup>
SC-3D	46,3 (64/138) <sup>B</sup>	5,7 (8/138) <sup>AB</sup>	47,1 (65/138) <sup>A</sup>	0,7 (1/138) <sup>A</sup>

<sup>A,B</sup> Different letters in the column indicate statistical significance ( $P < 0.05$ ).

‡ Oocytes with cumulus (CC) or without cumulus (SC) submitted to conventional MIV (2D) or with collagen matrix (3D).

VG, germinal vesicle; MI, metaphase I; MII, metaphase II.

Table 2. Logistic regression coefficients and odds ratio for factors associated with metaphase II after maturation *in vitro* bovine oocytes in conventional (2D) or collagen matrix associated (3D) culture systems

Factors	Coefficient	P- Value	Odds ratio (IC 95%)
Cumulus cells <sup>1</sup>	0,561	0,001	1,75 (1,25 - 2,45)
Culture system <sup>2</sup>	0,079	0,643	1,08 (0,77 - 1,51)
Intercepto	-0,208		

\* Dependent variable: metaphasis II (no = 0; yes = 1).

<sup>1</sup>Cumulus cells: no = 0; yes = 1.

<sup>2</sup>Culture system: 2D = 0; 3D = 1.



Table 3. Odds ratio analysis for the type of culture system (conventional - 2D or with collagen membrane - 3D) and the presence or absence of cells from the cumulus on the oocyte rate in metaphase II after *in vitro* maturation.

‡ Treatment - Comparisons	Metaphasis II (%)	Odds ratio (95% I.C)	P - Value
CC-2D	59,0 (85/144)	0,9 (0,5 – 1,5)	0,9274
CC-3D	60,3 (76/126)		
CC-2D	59,0 (85/144)	1,8 (1,1 – 2,8)	0,0186
SC-2D	44,5 (65/146)		
CC-2D	59,0 (85/144)	1,6 (1,0 – 2,5)	0,0592
SC-3D	47,1 (65/138)		
CC-3D	60,3 (76/126)	1,8 (1,1 – 3,0)	0,0132
SC-2D	44,5 (65/146)		
CC-3D	60,3 (76/126)	1,7 (1,0 – 2,7)	0,0427
SC-3D	47,1 (65/138)		

‡ Oocytes with cumulus (CC) or without cumulus (SC) submitted to conventional MIV (2D) or with collagen matrix (3D).  
I.C: 95% confidence interval.

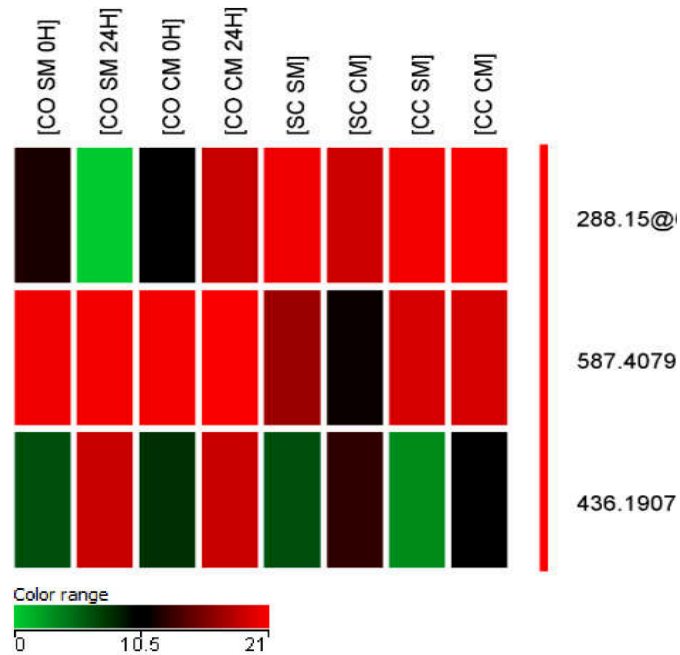


Figure 1. Heatmap with the main metabolites identified after in vitro maturation of bovine oocytes in conventional (2D) or collagen matrix (3D) cultures in the presence (CC) or absence (SC) of cumulus cells.

†Medium collected after 24 hours of culture in the absence (Control-2D) or presence (Control-3D) of collagen matrix.

### **CAPÍTULO 3 - Maturação *in vitro* de ovócitos bovinos em sistema de cultivo tridimensional com membrana de colágeno: comparação de diferentes metodologias para a avaliação da retomada da meiose**

#### **Resumo**

A relação entre ovócitos e células somáticas é um fator determinante na maturação e cultivo *in vitro*. O objetivo do presente estudo foi avaliar a retomada de meiose de ovócitos bovinos (n = 568) maturados *in vitro* com (CC) e sem células do cúmulo (SC) em sistemas de cultivo convencional (2D) ou tridimensional com matriz de colágeno (3D). Em adição, duas metodologias (microscópio invertido e microscopia de fluorescência) foram utilizadas para a avaliação da retomada da meiose. Na avaliação por microscópio invertido, o tratamento CC-3D apresentou maior porcentagem ( $P < 0,05$ ) de ovócitos com formação de corpúsculo polar em comparação aos tratamentos CC-2D e SC-2D. Na microscopia de fluorescência, os tratamentos CC-2D e CC-3D apresentaram percentual semelhante ( $P > 0,05$ ) de ovócitos em metáfase II (MII). Os parâmetros vesícula germinativa *vs.* ausência de corpúsculo polar e MII *vs.* presença de corpúsculo polar foram comparados entre as abordagens utilizadas. No geral, a retomada de meiose identificada pela presença do corpúsculo polar foi subestimada quando utilizado o microscópio invertido. Em adição, o coeficiente Kappa determinado (0,2642;  $P < 0,0001$ ) indicou um fraco grau de replicabilidade entre as metodologias. Em síntese, considerando a análise de microscopia de fluorescência como padrão ouro, a retomada da meiose foi semelhante entre os sistemas 2D e 3D. No entanto, a ausência de células do cúmulo comprometeu a retomada da meiose em ambos os sistemas. Em adição, ovócitos maturados no sistema 3D apresentaram maior ocorrência de rotura da zona pelúcida.

**Palavras-chave:** células do cúmulo, colágeno, maturação *in vitro*, sistema tridimensional

**Abstract**

The relationship between oocytes and somatic cells is a determining factor in maturation and *in vitro* culture. The aim of the present study was to evaluate the resumption of bovine oocyte meiosis ( $n = 568$ ) matured *in vitro* with (CC) and without cumulus cells (SC) in conventional (2D) or three-dimensional culture systems with collagen matrix (3D) ). In addition, two methodologies (inverted microscope and fluorescence microscopy) were used to assess meiosis resumption. In the inverted microscope evaluation, the CC-3D treatment showed a higher percentage ( $P < 0.05$ ) of oocytes with polar body formation compared to the CC-2D and SC-2D treatments. In fluorescence microscopy, the CC-2D and CC-3D treatments showed a similar percentage ( $P > 0.05$ ) of oocytes in metaphase II (MII). The parameters germinal vesicle vs. absence of polar corpuscle and MII vs. polar corpuscle were compared between the approaches used. In general, the resumption of meiosis identified by the presence of the polar corpuscle was underestimated when using the inverted microscope. In addition, the Kappa coefficient determined (0.2642;  $P < 0.0001$ ) indicated a low degree of replicability between the methodologies. In summary, considering the fluorescence microscopy analysis as the gold standard, the resumption of meiosis was similar between 2D and 3D systems. However, the absence of cumulus cells compromised the resumption of meiosis in both systems. In addition, oocytes matured in the 3D system showed a greater occurrence of rupture of the pellucid zone.

**Keywords:** cumulus cells, collagen, *in vitro* maturation, three-dimensional culture system

## Introdução

A qualidade dos ovócitos disponíveis em um sistema de cultivo *in vitro* é fator limitante para aquisição da competência ovocitária e consequente capacidade de produção de uma progênie saudável. Independente da espécie, as taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário inicial após a maturação *in vitro* ainda são inferiores às aquelas obtidos *in vivo* (Chian, 2004) devido a diversos fatores, entre os quais podemos citar: (1) a heterogeneidade da população de ovócitos obtidos a partir de folículos com diferentes estágios de desenvolvimento (Stouffer e Zelinski-Wooten, 2004); (2) a presença de ovócitos sem células do cúmulus após a estimulação com gonadotrofinas (Combelles et al., 2005) e; (3) ausência de sincronia entre a maturação nuclear (prematura) e citoplasmática (Dieleman et al., 2002). Portanto, a interdependência entre ovócitos e células somáticas deve ser considerada como um fator determinante na maturação e cultivo *in vitro*.

Neste sentido, a interação entre os dois compartimentos celulares têm sido investigada por meio do desenvolvimento de sistemas de cultivo de ovócitos com: monocamadas de células do cúmulus ou granulosa (Hashimoto et al., 1998; Huang e Wells, 2010), fragmentos da parede folicular e bloqueadores de meiose (cilostamida) (Correia et al., 2019) e associados com matriz extracelular de colágeno em sistema tridimensional (Combelles et al., 2005; Ma et al., 2007). O sistema de cultivo tridimensional permite que linhagens celulares, células primárias e células-tronco possam ser colocadas em conjunto, formando estruturas densas em uma matriz extracelular que favorece a manutenção da morfologia, sobrevivência, migração, proliferação, e comunicação intercelular similares aos observados em tecidos (Haisler et al., 2013; Antonino et al., 2019).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência das células do cúmulus e do sistema de cultivo tridimensional com membrana de colágeno sobre a retomada de meiose de ovócitos bovinos maturados *in vitro*. Em adição, na biologia reprodutiva, o uso de metodologias incorretas para análise de diversos parâmetros pode induzir os pesquisadores a conclusões insatisfatórias ou enganosas. Dessa forma, as duas abordagens adotadas (microscópio invertido e microscopia de fluorescência) para a avaliação da retomada da meiose foram comparadas.

## Material e Métodos

### *Ovários*

O presente estudo foi isento de autorização pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (protocolo #A005/18) devido não manipular diretamente animais vivos para a obtenção das amostras. Ovários de fêmeas mestiças (*Bos taurus* × *Bos indicus*), com idade entre 24 a 48 meses, foram coletados em abatedouro local e transportados para o laboratório a temperatura de 35-37°C.

### *Desenho experimental*

No laboratório, os ovócitos foram obtidos de folículos ovarianos (3 a 8 mm de diâmetro) por punção com o auxílio de uma agulha (21G; BD, Brasil) acoplada a uma seringa de 10 mL (Norm-Ject® Luer Lock, Henke Sass Wolf, Alemanha). Os ovócitos (n = 568) foram selecionados sob estereoscópico (15×; Nikon®, SMZ-800, Japão) de acordo com a presença ou ausência de células do cúmulus e distribuídos nos seguintes tratamentos: CC-2D, ovócitos com células do cúmulus submetidos à maturação *in vitro* (MIV) convencional (sistema bidimensional - 2D); CC-3D, ovócitos com células do cúmulus submetidos à MIV sobre matriz de colágeno (sistema tridimensional - 3D); SC-2D, ovócitos sem células do cúmulus submetidos à MIV convencional (2D); e SC-3D, ovócitos sem células do cúmulus submetidos à MIV sobre matriz de colágeno. O total de 6 réplicas foram realizadas por tratamento.

### *Maturação in vitro (MIV)*

Os ovócitos foram submetidos à maturação *in vitro* em meio TCM-199 suplementado com 0,2 mM piruvato, 25 mM bicarbonato de sódio, 75 mg/mL gentamicina, 1 mg/mL 17- $\beta$  estradiol, 0,5 mg/mL FSH, 100 UI/mL hCG e 10% soro fetal bovino (v/v) (Lucio et al., 2016). Na média, 20 ovócitos foram maturados por gota (1000  $\mu$ L). No sistema 2D, os ovócitos foram maturados em placas de poço central, enquanto no sistema 3D, os ovócitos foram maturados sobre a membrana de colágeno. A MIV foi realizada em incubadora (Thermo Scientific Forma®, Série II 3110, EUA) por 22-24 horas (38.5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> e umidade saturada).

### *Análise da retomada da meiose - Microscópio invertido versus microscopia de fluorescência*

Após a MIV, os ovócitos foram lavados em meio contendo hialuronidase (Fertipo<sup>®</sup>, YYA001, Bélgica) por 60 segundos. Em seguida, foram submetidos a sucessivas pipetagens até a completa remoção das células do cúmulus. A retomada da meiose foi realizada por duas metodologias. Na primeira, a presença ou ausência do corpúsculo polar foi avaliada através de microscópio invertido com contraste de fase (Nikon<sup>®</sup> TE 2000, Japão). Na segunda, os ovócitos foram corados com Hoechst 33342 (15 minutos ao abrigo da luz) e avaliados em microscopia de fluorescência quanto à configuração da cromatina em vesícula germinativa (VG), metáfase I (MI) e metáfase II (MII). Em ambas as metodologias, os ovócitos com presença de rotura na zona pelúcida (extrusados) foram identificados.

#### *Análise estatística*

As análises foram realizadas no programa Sigma Plot versão 11 (Systat Software Inc., EUA). As variáveis (configuração da cromatina e presença de corpúsculo polar) foram comparadas entre os tratamentos pelos testes qui-quadrado ou exato de Fisher. O grau de concordância entre as metodologias (microscópio invertido *versus* microscopia de fluorescência) aplicadas para avaliar a retomada de meiose foi analisada pelo teste Kappa. Os dados foram apresentados na forma de porcentagem e considerados significativos quando  $P < 0,05$ .

### **Resultados**

O total de 568 ovócitos bovinos foram submetidos à maturação *in vitro* em sistemas de cultivo convencional (2D) ou associado a matriz de colágeno (3D). Diferentes abordagens foram utilizadas para a avaliação da cromatina do ovócito pós-maturação. Na avaliação por microscópio invertido, os parâmetros presença do corpúsculo polar e rotura da zona pelúcida (ZP) foram avaliados (**Tabela 1**). No geral, o tratamento CC-3D apresentou maior porcentagem ( $P < 0,05$ ) de ovócitos com formação de corpúsculo polar em comparação aos tratamentos CC-2D e SC-2D. No entanto, maior ( $P < 0,05$ ) proporção de ovócitos rotura da zona pelúcida (ZP) foi observado no tratamento CC-3D em relação aos demais.

A configuração da cromatina e a rotura da zona pelúcida foram avaliadas por microscopia de fluorescência (**Tabela 2**). A proporção de ovócitos em VG foi superior ( $P < 0,05$ ) nos tratamentos SC-2D e SC-3D em relação aos tratamentos CC-2D e CC-3D. Os tratamentos CC-2D e CC-3D apresentaram percentual semelhante ( $P > 0,05$ ) de ovócitos em metáfase II. Por outro lado, a porcentagem de ovócitos em metáfase II foi inferior ( $P < 0,05$ )

no tratamento SC-3D em comparação aos ovócitos com células do cúmulus (CC-2D e CC-3D). A taxa de rotura da zona pelúcida (ZP) foi superior ( $P < 0,05$ ) no tratamento CC-3D quando comparado aos demais.

Os parâmetros analisados VG *versus* ausência de corpúsculo polar e metáfase II *versus* presença de corpúsculo polar foram comparados entre as abordagens utilizadas (microscopia de fluorescência e microscópio invertido) (**Tabela 3**). No geral, a porcentagem de ovócitos em VG (microscopia de fluorescência) foi menor ( $P < 0,05$ ) em comparação com a proporção de ovócitos observados com ausência de corpúsculo polar (microscópio invertido). Em contrapartida, a porcentagem de ovócitos em metáfase II (microscopia de fluorescência) foi superior ( $P < 0,05$ ) em relação àqueles identificados com presença de corpúsculo polar (microscópio invertido). Em adição, o teste Kappa foi utilizado para avaliar o grau de concordância entre as metodologias utilizadas para a avaliação do mesmo parâmetro. O coeficiente Kappa determinado (0,2642;  $P < 0,0001$ ) indicou um fraco grau de replicabilidade entre as metodologias.

**Tabela 1.** Percentual de ovócitos bovinos avaliados em microscópio invertido com formação de corpúsculo polar e rotura da zona pelúcida (ZP) após a maturação *in vitro* em sistemas de cultivo convencional (2D) ou associado a matriz de colágeno (3D).

‡Tratamento	Presença do corpúsculo polar (%)		Rotura (ZP) (%)
	Não	Sim	
CC-2D	70,7 (106/150) <sup>B</sup>	28,7 (43/150) <sup>A</sup>	0,6 (1/150) <sup>A</sup>
CC-3D	42,3 (55/130) <sup>A</sup>	48,4 (63/130) <sup>B</sup>	9,2 (12/130) <sup>B</sup>
SC-2D	64,5 (93/144) <sup>B</sup>	34,7 (50/144) <sup>A</sup>	0,7 (1/144) <sup>A</sup>
SC-3D	60,4 (87/144) <sup>B</sup>	38,8 (56/144) <sup>AB</sup>	0,7 (1/144) <sup>A</sup>

<sup>A,B</sup> Letras diferentes na coluna indicam significância estatística ( $P < 0,05$ ).

‡ Ovócitos com cúmulus (CC) ou sem cúmulus (SC) submetidos a MIV convencional (2D) ou com matriz de colágeno (3D).



**Tabela 2.** Percentual de ovócitos bovinos avaliados por microscopia de fluorescência com retomada da meiose e rotura da zona pelúcida (ZP) após a maturação *in vitro* em sistemas de cultivo convencional (2D) ou associado a matriz de colágeno (3D).

‡Tratamento	Configuração da cromatina (%)		Rotura (ZP)(%)
	Vesícula germinativa	Metáfase II	
CC-2D	31,9 (47/147) <sup>A</sup>	65,3 (96/147) <sup>C</sup>	0,6 (1/147) <sup>A</sup>
CC-3D	27,0 (34/126) <sup>A</sup>	64,2 (81/126) <sup>BC</sup>	8,7 (11/126) <sup>B</sup>
SC-2D	42,7 (64/150) <sup>B</sup>	54,0 (81/150) <sup>AB</sup>	0,6 (1/150) <sup>A</sup>
SC-3D	45,4 (64/141) <sup>B</sup>	51,7 (73/141) <sup>A</sup>	0,7 (1/141) <sup>A</sup>

<sup>A,B,C</sup> Letras diferentes na coluna indicam significância estatística ( $P < 0,05$ ).

‡ Ovócitos com cúmulus (CC) ou sem cúmulus (SC) submetidos a MIV convencional (2D) ou com matriz de colágeno (3D).

**Tabela 3.** Comparação entre as abordagens utilizadas (microscopia de fluorescência vs. microscópio invertido) para avaliação da cromatina de ovócitos submetidos a maturação *in vitro* em sistemas de cultivo convencional (2D) ou associado a matriz de colágeno (3D).

‡Tratamento	Microscópio fluorescência		Microscópio invertido	
	Configuração da cromatina (%)		Presença do corpúsculo polar (%)	
	Vesícula germinativa	Metáfase II	Não	Sim
CC-2D	31,1 (28/90)	68,9 (62/90)	67,8 (61/90)	32,2 (29/90)
CC-3D	26,1 (12/46)	73,9 (34/46)	50,0 (23/46)	50,0 (23/46)
SC-2D	52,6 (61/116)	47,4 (55/116)	70,6 (82/116)	29,4 (34/116)
SC-3D	47,7 (41/86)	52,3 (45/86)	53,4 (46/86)	46,6 (40/86)
Total	42,0 (142/338) <sup>a</sup>	58,0 (196/338) <sup>A</sup>	62,7 (212/338) <sup>b</sup>	37,3 (126/338) <sup>B</sup>

<sup>a,b</sup> Na mesma linha, letras minúsculas indicam diferença entre os parâmetros VG vs. sem corpúsculo polar ( $P < 0,05$ ).

<sup>A,B</sup> Na mesma linha, letras maiúsculas indicam diferença entre os parâmetros metáfase II vs. corpúsculo polar ( $P < 0,05$ ).

‡ Ovócitos com cúmulus (CC) ou sem cúmulus (SC) submetidos a MIV convencional (2D) ou com matriz de colágeno (3D).

## Discussão

Neste estudo, diferentes sistemas de cultivo (convencional - 2D e com matriz de colágeno - 3D) foram utilizados para a MIV de ovócitos bovinos na ausência ou presença de células do cúmulus. Além disso, duas metodologias (microscópio invertido vs. microscopia de fluorescência) foram comparadas para a avaliação da retomada da meiose. No geral, os principais achados foram: (i) ovócitos com células do cúmulus cultivados sistema 3D apresentaram maior proporção de formação de corpúsculo polar quando avaliado pelo microscópio invertido; (ii) as taxas de metáfase II foram semelhantes entre os sistemas 2D e 3D em ovócitos com células do cúmulus analisados por microscopia de fluorescência e; (iii) fraca replicabilidade foi observada entre as abordagens utilizadas para análise da retomada da meiose.

Na avaliação por microscópio invertido, a formação de corpúsculo polar foi ~1,7 vezes superior em ovócitos com células do cúmulus maturados no sistema 3D em comparação ao convencional. As células do cúmulus possuem projeções citoplasmáticas transzonais que penetram a zona pelúcida e possibilitam, por meio de junções do tipo gap, a interação e a

troca de substâncias como hormônios, piruvato, aminoácidos de baixo peso molecular e fatores de crescimento importantes (fator de crescimento e diferenciação 9 - GDF9, proteína morfogenética óssea 15 - BMP15) para a maturação ovocitária (Albertini et al., 2001). Em bovinos, a competência ovocitária foi associada com a densidade de células do cúmulus presentes durante a maturação (Hashimoto et al., 1998), sugerindo dois mecanismos de ação: (1) secreção de fatores que promovem o desenvolvimento da competência e/ou (2) remoção/inibição de fatores supressivos para a maturação ovocitária. Apesar do ovócito exercer um papel central na regulação da função folicular, a comunicação bidirecional entre as células do cúmulus e o ovócito é essencial na transmissão de informação genética, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (Huang e Wells, 2010). A utilização de sistemas 3D com materiais como alginato (Xu et al., 2009), fibrina (Xu et al., 2013), colágeno (Abir et al., 2001) e nanopartículas (Antonino et al., 2019) para o cultivo *in vitro* de diferentes espécimes biológicos (tecido ovariano, folículos isolados e ovócitos) têm sido demonstrados. O sistema 3D leva em consideração a organização espacial da célula (Haisler et al., 2013), permitindo a manutenção da estrutura do ovócito e reduzindo a tensão sobre complexo granulosa-ovócito (Green e Shikanov, 2016). Além disso, estudos sugerem que o controle da maturação folicular no córtex ovariano pode estar associado à pressão física e rigidez do tecido, ressaltando a importância do ambiente tridimensional na progressão da competência ovocitária (Eppig, 2001; Woodruff e Shea, 2011).

A porcentagem de ovócitos em metáfase II não diferiu entre os sistemas de cultivo 2D e 3D. No entanto, dentro do mesmo sistema adotado (2D ou 3D), a metáfase II foi superior quando os ovócitos foram maturados com as células do cúmulus. Diversos fatores como (1) adequada maturação citoplasmática, molecular e nuclear (Chian, 2003); (2) polispermia (Jamieson et al., 1991); (3) condições de cultivo relacionadas ao meio (hormônios e suplementos) (Silva et al., 2017) e; (4) aspectos físicos como temperatura, tensão de oxigênio e co-cultivo celular (Combelles et al., 2005) influenciam a retomada da meiose e posterior fertilização e desenvolvimento embrionário inicial. Em adição, ovócitos desnudados antecipam a retomada da meiose e ativam precocemente comprometendo a sincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática (Ma et al., 2007). Neste sentido, o co-cultivo *in vitro* de ovócitos e células do cúmulus têm sido empregados em sistemas 3D com diferentes biomateriais como matriz óssea desmineralizada associada ao colágeno (Ma et al., 2007) e matriz de colágeno do tipo I (Combelles et al., 2005; Vanhoutte et al., 2009). O objetivo destas abordagens é mimetizar a condição fisiológica por meio de uma matriz extracelular que

permite a interação entre ovócitos desnudos (por exemplo, obtidos a partir da estimulação ovariana hormonal) e células do cúmulus dissociadas dentro de uma estrutura tridimensional (3D).

Superior porcentagem de ovócitos com lesão na zona pelúcida foi observado após a maturação *in vitro* no sistema 3D. A zona pelúcida é uma matriz glicoproteica que desempenha papel importante durante a ovogênese, interação entre os gametas e pós-fertilização impedindo a polispermia (Ferré et al., 2014). Zigotos viáveis e não viáveis apresentaram diferentes padrões de expressão gênica relacionados à fertilização, entre eles os genes ZP3 e ZP4, que podem comprometer a interação óvulo-espermatozoide e consequente fertilização (Yanez et al., 2016). A presença de uma zona pelúcida intacta aumenta a taxa de sobrevivência de ovócitos pós-criopreservação (Choi et al., 2015). Em embriões, danos na zona pelúcida após a vitrificação estão associados com a menor taxa de blastômeros viáveis (Van den Abbeel e Van Steirteghem, 2000). A maior proporção de ovócitos com danos na zona pelúcida observada em nosso experimento foi um achado inesperado em função das vantagens do sistema 3D previamente abordadas. Portanto, os efeitos da matriz de colágeno sobre a integridade estrutural do ovócito são dignos de atenção e devem ser investigados em posterior desenho experimental.

No presente estudo, duas metodologias foram utilizadas para a avaliação da retomada da meiose após a maturação *in vitro* e um reduzido coeficiente de concordância foi observado entre as técnicas de microscópio invertido e microscopia de fluorescência. Questionamentos frequentes entre os pesquisadores durante a análise de uma variável em relação aos resultados são: (1) diferentes métodos, (2) operadores distintos utilizando a mesma metodologia ou (3) um único operador repetindo a medição com métodos diferentes produziriam essencialmente o mesmo resultado? Para tanto, vários testes estatísticos podem ser utilizados para comparar e classificar uma metodologia como padrão ouro (Watson e Petrie, 2010). De fato, nossos achados demonstraram que a retomada de meiose identificada pela presença do corpúsculo polar foi subestimada em comparação com a observada pela microscopia de fluorescência. Esta permite uma avaliação mais criteriosa da progressão da meiose pela migração dos cromossomos e formação da placa metafásica (Li et al., 2006; Yi et al., 2013).

Em síntese, considerando os resultados obtidos por meio da análise de microscopia de fluorescência (eletivo como padrão ouro), a retomada da meiose após o cultivo *in vitro* de ovócitos com células do cúmulus foi semelhante entre os sistemas 2D e 3D. Dentro do mesmo

sistema avaliado (2D ou 3D), a ausência de células do cúmulus comprometeu a retomada da meiose. Em adição, ovócitos maturados no sistema 3D apresentaram maior ocorrência de danos na zona pelúcida.

## Referências

Abir R, Fisch B, Nitke S, et al. Morphological study of fully and partially isolated early human follicles. *Fertil Steril*. 75:141-46:2001.

Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, et al. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*. 121:647-53:2001.

Antonino DC, Soares MM, Júnior JM, et al. Three-dimensional levitation culture improves *in-vitro* growth of secondary follicles in bovine model. *Reprod Biomed Online*. 38:300-11:2019.

Chian RC. In-vitro maturation of human oocytes. *Reprod BioMed Online*. 18:148-166:2004.

Choi JK, Yue T, Huang H, et al. The crucial role of zona pellucida in cryopreservation of oocytes by vitrification. *Cryobiology*. 71:350-5:2015.

Combelles CMH, Fissore RA, Albertini DF, et al. *In vitro* maturation of human oocytes and cumulus cells using a co-culture three-dimensional collagen gel system. *Human Reprod*. 20:1349-58:2005.

Correia HHV, Vieira LA, Mielgo CM, et al. Cilostamide affects in a concentration and exposure time-dependent manner the viability and the kinetics of *in vitro* maturation of caprine and bovine oocytes. *Res Vet Sci*. 122:22-8:2019.

Dieleman SJ, Hendriksen PJ, Viuff D, et al. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology*. 57:5-20:2002.

Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122:829-38:2001.

Ferré M, Amati-Bonneau P, Morinière C, et al. Are zona pellucida genes involved in recurrent oocyte lysis observed during *in vitro* fertilization? *J Assist Reprod Genet*. 31:221-7:2014.

- Green LJ, Shikanov A. *In vitro* culture methods of preantral follicles. *Theriogenology*. 86:229-38:2016.
- Haisler WL, Timm DM, Gage JA, et al. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. *Nat Protoc*. 8:1940-49:2013.
- Hashimoto S, Saeki K, Nagao Y, et al. Effects of cumulus cell density during *in vitro* maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*. 49:1451-63:1998.
- Huang Z, Wells D. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome. *Mol Hum Reprod*. 16:715-25:2010.
- Jamieson ME, Fleming R, Kader S, et al. *In vivo* and *in vitro* maturation of human oocytes: effects on embryo development and polyspermic fertilization. *Fertil Steril*. 56:93-7:1991.
- Li Y, Feng HL, Cao YJ, et al. Confocal microscopic analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes matured *in vitro*. *Fertil Steril*. 85:827-32:2006.
- Lucio AC, Alves BG, Alves KA, et al. Selected sperm traits are simultaneously altered after scrotal heat stress and play specific roles in *in vitro* fertilization and embryonic development. *Theriogenology*. 86:924-33:2016.
- Ma S, Lin H, Miao Y, et al. The effect of three-dimensional demineralized bone matrix on *in vitro* cumulus-free oocyte maturation. *Biomaterials*. 28:3198-207:2007.
- Silva GM, Brito IR, Sales AD, et al. *In vitro* growth and maturation of isolated caprine preantral follicles: Influence of insulin and FSH concentration, culture dish, coculture, and oocyte size on meiotic resumption. *Theriogenology*. 90:32-41:2017.
- Stouffer RL, Zelinski-Wooten MB. Overriding follicle selection in controlled ovarian stimulation protocols: Quality vs quantity. *Reprod Biol Endocrinol*. 2:32:2004.
- Van Den Abbeel E, Van Steirteghem A. Zona pellucida damage to human embryos after cryopreservation and the consequences for their blastomere survival and *in vitro* viability. *Hum Reprod*. 15:373-8:2000,

Vanhoutte L, Nogueira D, De Sutter P. Prematuration of human denuded oocytes in a three-dimensional co-culture system: effects on meiosis progression and developmental competence. *Hum Reprod.* 24:658-69:2009.

Watson PF, Petrie A. Method agreement analysis: a review of correct methodology. *Theriogenology.* 73:1167-79:2010.

Woodruff TK, Shea LD. A new hypothesis regarding ovarian follicle development: ovarian rigidity as a regulator of selection and health. *J Assist Reprod Genet.* 28:3-6:2011.

Xu M, West-Farrell ER, Stouffer RL, et al. Encapsulated three-dimensional culture supports development of nonhuman primate secondary follicles. *Biol Reprod.* 81:587-94:2009.

Xu J, Lawson MS, Yeoman RR, et al. Fibrin promotes development and function of macaque primary follicles during encapsulated three-dimensional culture. *Hum Reprod.* 28:2187-200:2013.

Yanez LZ, Han J, Behr BB, et al. Human oocyte developmental potential is predicted by mechanical properties within hours after fertilization. *Nat Commun.* 7:10809:2016.

Yi K, Rubinstein B, Li R. Symmetry breaking and polarity establishment during mouse oocyte maturation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 368:20130002:2013.