

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**EFEITOS DE DIFERENTES INIBIDORES DA MEIOSE SOBRE A
MATURAÇÃO “IN VITRO” DE OÓCITOS BOVINOS E
SUBSEQUENTE TOLERÂNCIA DOS EMBRIÕES A
VITRIFICAÇÃO**

Rosiára Rosária Dias Maziero

Botucatu-SP
Março – 2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**EFEITOS DE DIFERENTES INIBIDORES DA MEIOSE SOBRE A
MATURAÇÃO “IN VITRO” DE OÓCITOS BOVINOS E
SUBSEQUENTE TOLERÂNCIA DOS EMBRIÕES A
VITRIFICAÇÃO**

Rosiára Rosária Dias Maziero

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal – Curso de Doutorado – Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Tit. Fernanda da Cruz Landim

Botucatu-SP

Março – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 9/5651

Maziero, Rosiara Rosaria Dias.

Efeitos de diferentes inibidores da meiose sobre a maturação in vitro de oócitos bovinos e subsequente tolerância dos embriões a vitrificação / Rosiara Rosaria Dias Maziero. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Fernanda da Cruz Landim

Capes: 50504002

1. Bovino - Reprodução. 2. Criopreservação. 3. Embrião. 4. Técnicas de maturação in vitro de oócitos. 5. Oócitos. 6. Meiose.

Palavras-chave: Bovina; Butirolactona I; Criopreservação; Roscovitina.

Nome da Autora: Rosiára Rosária Dias Maziero

Título: Efeitos de diferentes inibidores da meiose sobre a maturação *in vitro* de oócitos bovinos e subsequente tolerância dos embriões a vitrificação.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Tit. Fernanda da Cruz Landim

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Maria Denise Lopes

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Alicio Martins Júnior

Membro

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal

FMVA – UNESP – Araçatuba

Prof. Edson Guimarães Lo Turco

Membro

Departamento de Urologia da Escola Paulista de Medicina

UNIFESP – São Paulo

Data da Defesa: 17 de Março de 2014.

Dedico esta tese à minha família,

Ao meu pai Mauro, que sempre será minha força, minha luz, meu motivo para seguir adiante e concretizar meus sonhos. Te amo muito Pai, aonde estiver, saiba que sempre será meu exemplo de alegria, dedicação e força para o trabalho. Infelizmente sua perda inesperada, não o fez acompanhar esta defesa, mas sua ajuda e amor em todos os momentos da minha vida, sempre estarão comigo. Amo muito você!

A minha mãe Rosaly pelo apoio, amor e pela força necessária para eu continuar meu caminho.

Ao meu irmão Ralf por todo o carinho e amor de sempre e para sempre.

Ao meu amor Carlos Renato, por todo companheirismo, apoio, força e amor. Por ser meu alicerce para conseguir vencer mais esta etapa. Por ser minha maior certeza, em meio a tantas dúvidas. Te amo muito.

*“No porto de antes, apreensivo, eu tentava imaginar
as dificuldades e lutas futuras.*

*No de agora, dono do tempo que eu conquistara,
simplesmente admirava o que
estava ao meu redor e desfrutava do que estava feito.*

*Não era a sensação de uma
batalha ganha, de uma luta em que os obstáculos
estavam vencidos. Muito mais do
que isso; era o prazer interior de ter realizado algo
que tanto desejei, de ter feito e
visto o que eu fiz e vi”.*

(Amyr Klink)

Agradecimentos

Ao meu **Pai Mauro Aparecido Maziero**, que se foi de modo tão inesperado, e na véspera da minha defesa. Pai sinto muito a sua falta, meu exemplo de alegria, dedicação ao trabalho, amor e respeito pela família. Muito obrigada por me dar a vida e fazer dela, sempre uma grande alegria. Te amo muito meu paizinho, “eu tive um pai e você uma filha”.

À **Profa Dra Fernanda da Cruz Landim** por me aceitar como sua orientada em um momento decisivo da minha carreira profissional, por me incentivar, apoiar e sempre me deixar à vontade para fazer as melhores escolhas ao longo do meu experimento, pelos momentos de descontração e por ser sempre uma Grande Amiga! Muito Obrigada!

Ao **Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa** por sempre estar disponível em ajudar, por ser uma pessoa sempre dedicada em ensinar, por se preocupar com meu experimento nos momentos mais difíceis, pelos momentos agradáveis e por ser um tão amigo!

Ao **Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira** pela amizade, pelos ensinamentos desde o início da minha carreira acadêmica, pelas orientações em minhas Iniciações Científicas, por ser meu grande amigo em todas as horas decisivas, muito obrigada!

A minha **Mãe Rosaly**, ao meu **irmão Ralf** e **seu bebê** que está por vir! Muito obrigada por vocês três serem minha vida!

Ao meu amor **Carlos Renato de Freitas Guaitolini**, por todo companheirismo, amor e dedicação!!! Por fazer tudo parecer mais fácil com a tua presença, por mostrar que existe sempre uma solução, por estar sempre ao meu lado em meio a tanta dor que estamos passando, e muito obrigada pela ajuda nos experimentos! Amo muito você!

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária: **Nereu Carlos Prestes**, **Maria Denise Lopes**, **Eunice Oba**, **Sony Dimas Bicudo**, **Cezinande Meira**, **Marco Antonio Alvarenga** por todos os ensinamentos durante a minha graduação, residência, mestrado e durante todo o meu doutorado, muito obrigada!

As minhas queridas amigas **Daniela Martins Paschoal**, **Midyan Daroz Guastali**, **Priscilla Nascimento Guasti**, **Patricia de Mello Papa**, **Caroline Destro** e **Camila de Paula Freitas Dell’Aqua** por serem companheiras em todos os momentos,

pela amizade, pelo respeito e por fazerem estes anos de trabalho um período tão divertido e de um aprendizado extremo!

Aos meus **queridos amigos da XXXIX Turma de Medicina Veterinária** da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. A todos vocês que fazem parte da minha vida! Em especial a Silvia Schaaf (Tuxa), Maria Clara (Dani), Liliane Celita (Malzinha), Marcella Sanches (Moco), Carolina Balarini Zetun (Xups), Paulo Carnicelli (Sodo), Luis Fernando Negro Silva (Tenesmo), Leticia Curvelo (Minrosca), Claudia Dias Monteiro (Tragédia), Hugo Toma (Marrento), Laura Lorenzetti Jorge (Trepadeira) e Marcel Cavalcanti Farras (Braxola), saudades sempre!

Aos amigos e pós-graduandos em especial **Ian Martin, Bianca Andriolo Monteiro, Hélène Resende, Paula Bertoni, Mateus José Sudano, Gabriel Augusto Monteiro e Thatiane Kievitsbosch** muito obrigada por toda amizade!

Ao amigo **André Maciel Crespilho** pela ajuda com as análises estatísticas! Muito obrigada!

A **Shelly Favorito de Carvalho** por toda ajuda com a microscopia eletrônica de transmissão e com o microscópio confocal.

A **Profa Dra Ligia Mota** pela disponibilidade em ajudar com cariótipo!

Ao **Prof. Dr. Edson Guimarães Lo Turco** e suas orientadas **Camila Chavier, Raquel Ronchetti e Fernanda Cordeiro** pelo incentivo e colaboração com as análises do meu experimento.

Aos **funcionários do Departamento de Reprodução Animal** Valter, Cristina, Edilsone Raquel muito obrigada!

Ao **funcionário Plínio**, do Frigorífico Frigoll de Lencóis Paulista, muito obrigada por ceder os ovários para que fosse possível a realização deste experimento!

A **Andrea Basso** pela doação de meios da **In Vitro Brasil** para que fosse possível a realização de grande parte deste trabalho, muito obrigada!

A todos os **meus familiares**, minha avó Rosinha, avó Cida, todos os meus tios, tias, primos, primas, amo muito vocês e obrigada por tudo!

A **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela bolsa e pelo auxílio financeiro (2010/18994-4 e 2011/08926-4) cedidos, muito obrigada!

LISTA DE TABELAS**Capítulo 2**

- Tabela 1- Resultados (média \pm desvio padrão) de estágios de desenvolvimento temporal de oócitos bovinos, após MIV em meio contendo Roscovitina em diferentes concentrações e tempos de exposição.....61
- Tabela 2- Resultados (média \pm desvio padrão) de estágios de desenvolvimento temporal de oócitos bovinos, após MIV em meio contendo Butirolactona I em diferentes concentrações e tempos de exposição.....62
- Tabela 3- Resultados (média \pm desvio padrão) de estágios de desenvolvimento temporal de oócitos bovinos, após MIV em meio contendo Roscovitina + Butirolactona I em diferentes concentrações e tempos de exposição.....63
- Tabela 4- Taxa de formação de blastocistos (%) avaliados no D7 com inibição meiótica utilizando ROS, BL-I e associação de ROS + BL-I por 6 horas e reversão da meiose por 18 horas.....64
- Tabela 5- Taxa de formação de blastocistos avaliados no D7 com inibição meiótica por 12 horas e reversão da meiose por 12 horas.....65
- Tabela 6- Média do número total de células/embrião e taxa de células lesionadas dos blastocistos expandidos nos tratamentos de 6 horas de inibição e 18 horas de reversão da meiose e nos tratamentos de 12 horas de inibição e de 12 horas de reversão da meiose.....65

Capítulo 3

- Tabela 1- Média (%) dos diferentes fármacos inibidores da meiose: a ROS, a BL-I e a associação ROS + BL-I sobre a porcentagem de clivagem/oócitos no dia três (D3) de desenvolvimento embrionário.....79
- Tabela 2- Taxa de formação de blastocistos (%) avaliados no **dia 6** (D6) com inibição meiótica por 6 horas e reversão da meiose por 18 horas.....80
- Tabela 3- Taxa de formação de blastocistos (%) avaliados no **dia 7** (D7) com inibição meiótica por 6 horas e reversão da meiose por 18 horas.....81
- Tabela 4- Média (desvio padrão) do número total de células e de células apoptóticas

	dos blastocistos bovinos frescos.....	82
Tabela 5-	Número total de células e células apoptóticas dos blastocistos bovinos aquecidos, número total de embriões vitrificados e da porcentagem de reexpansão embrionária.....	83

Capítulo 4

Tabela 1-	Avaliação da maturação nuclear com Hoechst 33342 de imaturos, oócitos maturados por 6 horas com ROS, BL-I e ROS + BL-I. Total de 5 réplicas com 300 oócitos (média ± desvio padrão).....	105
Tabela 2-	Avaliação da maturação nuclear com Hoechst 33342, oócitos controle maturados por 24 horas, oócitos bloqueados por 6 horas com ROS, BL-I e ROS + BL-I seguido da maturação livre do agente por 18 horas. Total de 5 réplicas com 300 oócitos (média ± desvio padrão).....	106
Tabela 3-	Intensidade de fluorescência distribuição da proteína ERK1/2 no ooplasma de oócitos imaturo, controle 6 horas, oócitos inibidos com ROS por 6 horas, BL-I por 6 horas e associação de ROS + BL-I por 6 horas. Oócitos do grupo controle maturados por 24 horas, revertidos dos grupos ROS, BL-I e ROS + BL-I por 18 horas. Total de 10 réplicas e n = 20 por grupo (média ± erro padrão).....	107
Tabela 4-	Intensidade de fluorescência distribuição da proteína Ciclina B1 no ooplasma de oócitos imaturo, controle 6 horas, oócitos inibidos com ROS por 6 horas, BL-I por 6 horas e associação de ROS + BL-I por 6 horas. Oócitos do grupo controle maturados por 24 horas, revertidos dos grupos ROS, BL-I e ROS + BL-I por 18 horas. Total de 10 réplicas e n = 20 por grupo (média ± erro padrão).....	112
Tabela 5-	Intensidade de fluorescência distribuição da proteína p34^{cdc2} no ooplasma de oócitos imaturo, controle 6 horas, oócitos inibidos com ROS por 6 horas, BL-I por 6 horas e associação de ROS + BL-I por 6 horas. Oócitos do grupo controle maturados por 24 horas, revertidos dos grupos ROS, BL-I e ROS + BL-I por 18 horas. Total de 10 réplicas e n = 20 por grupo (média ± erro padrão).....	117

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1- Esquema ilustrando os eventos do bloqueio e reinício da meiose oocitária. **A:** evento ocorrido durante o bloqueio da meiose, com o núcleo em estágio de vesícula germinativa (VG). **B:** evento normal da meiose oocitária, onde há uma diminuição nos níveis de cAMP, ativação do fator promotor de maturação (MPF), quebra da vesícula germinativa (QVG) e maturação oocitária (Adaptado BILODEAU-GOESEELS, 2012).....11
- Figura 2- Apresentação fotográfica da avaliação dos estágios nucleares dos oócitos dos grupos experimentais em microscópio invertido com luz fluorescente ultravioleta. Após a coloração com Hoechst 33342 os oócitos foram classificados em: Vesícula Germinativa (VG); Quebra da Vesícula Germinativa (QVG); Metáfase I (M I); Metáfase II (M II) e Degenerado ou Não Identificado (D/NI). Aumento de 400x.....13
- Figura 3- Esquema da distribuição das organelas citoplasmáticas durante a maturação, fertilização e formação do zigoto bovino. **A:** progressão da maturação nuclear e movimentação das organelas citoplasmáticas, desde o estágio de vesícula germinativa (VG) até a metáfase II (M II) e estágio de formação do embrião. **B:** distribuição das organelas, disposição dos grânulos corticais (GC) e fecundação do espermatozóide (FERREIRA et al., 2009).....18

Capítulo 2

- Figura 1- Embriões bovinos dos diferentes grupos submetidos à técnica TUNEL avaliados em microscópio de fluorescência invertido. **CN:** controle negativo da técnica; **CP:** controle positivo da técnica. **A e A':** grupo Controle; **B e B':** grupo BL-I 50 μ M 6 h; **C e C':** grupo ROS 12,5 μ M 6 h; **D e D':** grupo ROS + BL-I (6,25 μ M.+ 25 μ M) 6 h. Coloração azul (Hoescht) representa o número total de células íntegras. Coloração verde

	(FITC) indica o DNA fragmentado de células apoptóticas. Aumento de 400 x. Barra: 100 μ m.....66
Figura 2-	Embriões bovinos dos diferentes grupos submetidos à técnica TUNEL avaliados em microscópio de fluorescência invertido. CN : controle negativo da técnica; CP : controle positivo da técnica. A e A' : grupo Controle; B e B' : grupo BL-I 50 μ M 12 h; C e C' : grupo ROS 12,5 μ M 12 h; D e D' : grupo ROS + BL-I (6,25 μ M + 25 μ M) 12 h. Coloração azul (Hoescht) representa o número total de células íntegras. Coloração verde (FITC) indica o DNA fragmentado de células apoptóticas. Aumento de 400 x. Barra: 100 μ m.....67

Capítulo 3

Figura 1-	A. Oócitos imaturos. B. Oócitos maturados por 6 horas. C. Oócitos maturados por 24 horas. Identificação da proteína ERK1/2.....109
Figura 2-	A. Oócitos bloqueados com ROS por 6 horas. B. Oócitos bloqueados com ROS por 6 horas e colocados em meio livre de fármaco por 18 horas. Identificação da proteína ERK1/2.....110
Figura 3-	A. Oócitos bloqueados com BL-I por 6 horas. B. Oócitos bloqueados com BL-I por 6 horas e colocados em meio livre de fármaco por 18 horas. Identificação da proteína ERK1/2.....110
Figura 4-	A. Oócitos bloqueados com ROS + BL-I por 6 horas. B. Oócitos bloqueados com ROS + BL-I por 6 horas e colocados em meio livre de fármaco por 18 horas. Identificação da proteína ERK1/2.....111
Figura 5-	A. Oócitos imaturos corados com Hoescht e Anticorpo. B. Oócitos imaturos corados com Anticorpo. C. Oócitos maturados por 6 horas. D. Oócitos maturados por 24 horas. Identificação da proteína ciclina B1.....113
Figura 6-	A. Oócitos bloqueados com ROS por 6 horas. B. Oócitos bloqueados com ROS por 6 horas e colocados em meio livre de fármaco por 18 horas. Identificação da proteína Ciclina B1.114
Figura 7-	A. Oócitos bloqueados com BL-I por 6 horas. B. Oócitos bloqueados com BL-I por 6 horas e colocados em meio livre de fármaco por 18 horas. Identificação da proteína Ciclina B1.114

- Figura 8- **A.** Oócitos bloqueados com ROS + BL-I por 6 horas. **B.** Oócitos bloqueados com ROS + BL-I por 6 horas e colocados em meio livre de fármaco por 18 horas. Identificação da proteína Ciclina B1.....115
- Figura 9- **A.** Oócitos imaturos corados com Hoescht e Anticorpo. **B.** Oócitos imaturos corados com Anticorpo. **C.** Oócitos maturados por 6 horas. **D.** Oócitos maturados por 24 horas. Identificação da proteína p34^{cdc2}.....118
- Figura 10- **A.** Oócitos bloqueados com ROS por 6 horas. **B.** Oócitos bloqueados com ROS por 6 horas e colocados em meio livre de fármaco por 18 horas. Identificação da proteína p34^{cdc2}.....119
- Figura 11- **A.** Oócitos bloqueados com BL-I por 6 horas. **B.** Oócitos bloqueados com BL-I por 6 horas e colocados em meio livre de fármaco por 18 horas. Identificação da proteína p34^{cdc2}.....119
- Figura 12- **A.** Oócitos bloqueados com ROS + BL-I por 6 horas. **B.** Oócitos bloqueados com ROS + BL-I por 6 horas e colocados em meio livre de fármaco por 18 horas. Identificação da proteína p34^{cdc2}.....120
- Figura 13- Avaliação em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de oócitos do grupo Imaturo (0 hora). **A:** células da granulosa (CG) bem compactas. **B:** presença de “cluster” de grânulos corticais (GC), mitocôndrias (Mt) e grânulos lipídicos (GL). **C:** espaço perivitelinico (EP) bem dilatado. **D:** presença de microvilosidades (Mv) e junções das células da granulosa do tipo junção intermediária (JI) e retículo endoplasmático liso (REL). Cit: citoplasma. ZP: zona pelúcida.....122
- Figura 14- Avaliação em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de oócitos do grupo 6 horas. **A:** presença de grânulos corticais e mitocôndrias. **B:** presença de “cluster” de grânulos corticais (GC), mitocôndrias (Mt) e grânulos lipídicos (GL). **C:** células da granulosa (CG) bem dispersas, zona pelúcida (ZP) bem evidente. **D:** célula da granulosa, núcleo bem evidente, retículo endoplasmático liso (REL) e gotas lipídicas.....123
- Figura 15- Avaliação em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de oócitos do grupo 24 horas. **A:** característica normal das células da granulosa (CG) após 24 horas de maturação, com aspecto expandido. **B:** citoplasma contendo associações de mitocôndrias (Mt) e grânulos lipídicos (GL). Observar que os “clusters” de grânulos corticais (GC) se

desfizeram e se direcionaram para a periferia do ooplasma. **C:** resolução maior do ooplasma demonstrando a associação existente entre mitocôndrias (Mt) e retículo endoplasmático liso (REL), as junções intermediárias (JI) e os grânulos corticais (GC) periféricos. **D:** presença de grânulos lipídicos (GL) já em processo de metabolização pelas mitocôndrias (Mt). Cit: citoplasma. ZP: zona pelúcida.....124

Figura 16 Avaliação em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de oócitos do grupo ROS somente bloqueados (A e B) e bloqueados e revertidos (C e D). **A:** Oócitos do grupo ROS 12,5 μ M foram bloqueados por 6 horas – apresentaram alta metabolização dos grânulos lipídicos (GL). **B:** Oócitos do grupo ROS que foram bloqueados por 6 horas – apresentaram uma alta metabolização dos grânulos lipídicos (GL), demonstrado pela grande desorganização do citoplasma (Cit). **C:** Oócitos do grupo ROS que foram bloqueados por 6 horas e revertidos por 18 horas – demonstraram uma melhor preservação de suas estruturas. Observar que os “clusters” de grânulos corticais (GC) próximos a zona pelúcida, grande quantidade de microvilosidades. **D:** Oócitos do grupo ROS que foram bloqueados por 6 horas e revertidos por 18 horas – apresentaram uma desorganização das estruturas citoplasmáticas. EP: espaço perivitelínico. Presença de microvilosidades (Mv). Podemos observar os grânulos corticais (GC) localizados próximos a ZP.....126

Figura 17- Avaliação em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de oócitos do grupo BL-I somente bloqueados (A e B) e bloqueados e revertidos (C e D). **A:** Oócitos do grupo BL-I 50 μ M foram bloqueados por 6 horas – apresentaram uma melhor preservação do citoplasma. **B:** Oócitos do grupo BL-I que foram bloqueados por 6 horas, presença de grânulos lipídicos, microvilosidades e presença de grânulos corticais migrando próximo a zona pelúcida. **C:** Oócitos do grupo BL-I que foram bloqueados por 6 horas e revertidos por 18 horas – característica normal das células da granulosa (CG) após 24 horas de maturação, com aspecto expandido. **D:** Oócitos do grupo BL-I que foram bloqueados por 6 horas e revertidos por 18 horas, presença de grânulos corticais próximos a

	zona pelúcida, mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e grânulos lipídicos.....	128
Figura 18-	Avaliação em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de oócitos do grupo ROS + BL-I somente bloqueados (A e B) e bloqueados e revertidos (C e D). A: Oócitos do grupo ROS (6,25 μ M) + BL-I (25 μ M) foram bloqueados por 6 horas células da granulosa (CG) bem compactas. B: Oócitos do grupo ROS + BL-I que foram bloqueados por 6 horas – apresentaram uma alta metabolização dos grânulos lipídicos (GL), demonstrado pela grande desorganização do citoplasma (Cit). C: Oócitos do grupo ROS + BL-I que foram bloqueados por 6 horas e revertidos por 18 horas –. Observar que os “clusters” de grânulos corticais (GC) se desfizeram e se direcionaram para a periferia do ooplasma D: Oócitos do grupo ROS + BL-I que foram bloqueados por 6 horas e revertidos por 18 horas – já em processo de metabolização pelas mitocôndrias (Mt).....	130

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

- µg: micrograma
µL: microlitro
µM: micromolar
ATP: adenosina trifosfato
Be: blastocisto eclodido
Bi: blastocisto inicial
BL: blastocele
Bl: blastocisto
BL-I: butirolactona I
Bn: blastocisto em eclosão
BSA: albumina sérica bovina
Bx: blastocisto expandido
Ca²⁺: cálcio
cAMP: monofosfato cíclico de adenosina
CCOs: complexos *cumulus oophorus*
CG: células da granulosa
Cit: citoplasma
CIV: cultivo *in vitro*
cm: centímetro
CN: controle negativo
CO₂: gás carbônico
CP: controle positivo
D 6: sexto dia
D 7: sétimo dia
D/NI: degenerado ou não identificado
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico
EG: etileno glicol
EP: espaço perivitelínico
EROs: espécies reativas de oxigênio
FIV: fertilização *in vitro*
MPF: fator promotor da maturação

FSH: hormônio folículo estimulante
g: grama
GC: grânulos corticais
GL: grânulos lipídicos
HTF: Human Tubal Fluid
JI: junções intermediárias
LH: hormônio luteinizante
MI: Metáfase I
MII: Metáfase II
M: molar
MB: Meio Base
MCI: massa celular interna
MCP: morte celular programada
MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão
mg: miligrama
MIV: maturação *in vitro*
mL: mililitro
mM: milimolar
mm: milímetro
mRNA: RNA Mensageiro
Mt: mitocôndria
Mv: microvilosidades
MV1: Meio de Vitrificação 1
MV2: Meio de Vitrificação 2
N: núcleo
N₂: nitrogênio
NaCl: cloreto de sódio
OPS: open pulled straw
PBS: phosphate buffered saline
PDE: fosfodiesterase
PIV: produção *in vitro*
PKA: proteína quinase
PVA: álcool polivinil
PVP: polivinilpirrolidona

QVG: quebra da vesícula germinativa

RE: retículo endoplasmático

REL: retículo endoplasmático liso

RNA: ácido ribonucleico

ROS: roscovitina

rRNA: RNA Ribossomal

SFB: soro fetal bovino

SOFaa: Synthetic Oviductal Fluid mais aminoácidos

TCM 199: Tissue Culture Medium

TE: transferência de embriões

TUNEL: Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End Labeling

UI: Unidades Internacionais

v/v: volume por volume

VG: vesícula germinativa

ZP: zona pelúcida

α : alfa

β : beta

SUMÁRIO

<i>Capítulo 1</i>	1
Introdução	2
Objetivos Gerais	4
Objetivos Específicos	4
Hipóteses.....	7
Revisão de Literatura	8
1. Maturação oocitária	8
1.1 Maturação nuclear.....	10
1.2 Maturação citoplasmática	13
1.2.1 Redistribuição das organelas citoplasmáticas.....	14
1.3 Maturação molecular.....	18
2. Fármacos inibidores da meiose.....	22
2.1 Butirolactona I (BL-I)	22
2.2 Roscovitina (ROS)	24
2.3 Associação de Butirolactona I (BL-I) e Roscovitina (ROS).....	25
2.4 Alterações ultraestruturais com a utilização de fármacos inibidores da meiose oocitária.....	26
3. Apoptose celular	29
4. Vitrificação de embriões produzidos <i>in vitro</i>	31
<i>Capítulo 2</i>	35
“Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos utilizando-se oócitos maturados por diferentes tempos na presença de roscovitina, butirolactona-I e suas associações.”.....	36
Resumo	37
Introdução	39
Material e Métodos	41
Coleta dos ovários, punção folicular e Maturação <i>in vitro</i>	41
Inibição meiótica.....	42
Roscovitina (Roscovitine R7772 Sigma \geq 98)	42
Butirolactona I (BML-CC210-1000).....	42
Roscovitina + Butirolactona-I	43
Avaliação da maturação oocitária	43
Fertilização <i>in vitro</i>	44

Cultivo <i>in vitro</i>	44
Avaliação da apoptose celular - TUNEL (Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End Labeling)	45
Análise Estatística	46
Resultados	46
Roscovitina	47
Butirolactona-I	48
Butirolactona I + Roscovitina	49
Discussão	50
Roscovitina	50
Butirolactona I	54
Butirolactona I + Roscovitina	56
Conclusão	57
Referências	58
<i>Capítulo 3</i>	68
“Vitrificação de embriões bovinos produzidos após utilização de butirolactona I e de roscovitina durante a maturação <i>in vitro</i> ”	69
RESUMO	70
1. Introdução	72
2. Material e Métodos	73
2.1 Coleta dos ovários, punção folicular e maturação <i>in vitro</i> (MIV)	74
2.2 Inibição meiótica	74
2.2.1 Roscovitina (Roscovitine R7772 Sigma ≥ 98)	74
2.2.2 Butirolactona I (BML-CC210-1000)	75
2.2.3 Roscovitina + Butirolactona-I	75
2.3. Fertilização <i>in vitro</i>	75
2.4. Cultivo <i>in vitro</i> e vitrificação	75
2.5. Avaliação do índice de apoptose	76
2.6. Análise Estatística	77
3. Resultados	78
4. Discussão	82
5. Conclusões	89
6. Referências	89
<i>Capítulo 4</i>	95

“Efeito da adição de fármacos inibidores da meiose oocitária na atividade do fator promotor de maturação e na organização das organelas citoplasmáticas”	96
RESUMO	97
1. Introdução	99
2. Material e Métodos	101
2.1 Coleta dos ovários, punção folicular e maturação <i>in vitro</i> (MIV)	101
2.2 Inibição meiótica	101
2.2.1 Roscovitina (Roscovitine R7772 Sigma ≥ 98)	101
2.2.2 Butirolactona I (BML-CC210-1000)	102
2.2.3 Roscovitina + Butirolactona-I	102
2.3 Avaliação do estágio de maturação nuclear	102
2.4 Imunofluorescência para detecção da atividade e localização das proteínas ERK1/2, Ciclina B1 e p34 ^{cdc2}	103
2.5 Avaliação da ultraestrutura oocitária	103
2.6 Análise estatística	104
3. Resultados	104
3.1 Avaliação do estágio de maturação nuclear	104
3.2 Imunofluorescência para detecção da atividade e localização das proteínas ERK1/2, Ciclina B1 e p34 ^{cdc2}	106
3.2.1 Proteína ERK 1/2	106
3.2.2 Proteína Ciclina B1	111
3.2.3 Proteína p34 ^{cdc2}	115
3.3 Avaliação da ultraestrutura oocitária	120
4. Discussão	131
5. Conclusão	141
Referências	141
<i>Capítulo 5</i>	147
Conclusões Gerais	148
Referências	150
Anexo	164
Normas para publicação na <i>Reproduction in Domestic Animals</i>	164

MAZIERO, R.R.D. **Efeitos de diferentes inibidores da meiose sobre a maturação *in vitro* de oócitos bovinos e subsequente tolerância dos embriões a vitrificação.** Botucatu, 2014. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo geral averiguar o efeito da BL-I e da ROS em bloquear temporariamente a retomada da meiose, atuando sobre os fatores que controlam o ciclo celular meiótico de oócitos bovinos e a expansão das células do *cumulus oophorus*. No Experimento I, os oócitos permaneceram em meio MIV durante 6, 12 e 24 h na presença de duas concentrações de ROS (12,5 μM e 25 μM) ou na presença de BL-I (50 μM e 100 μM) ou na presença da associação de ROS (6,25 μM) + BL-I (25 μM) e em seguida foram cultivados em meio MIV livre de fármacos por 18 h, 12 h ou 24 h. Após esse tempo, os oócitos inibidos por 6 ou 12 h foram fertilizados e cultivados *in vitro*. O tratamento com ROS e BL-I não resultou em atraso na quebra da vesícula germinativa em relação ao controle. Entretanto, quando utilizados por 24 h, elevadas taxas de degeneração oocitária foram encontradas. Quando estes fármacos foram utilizados por 12 h com reversão por mais 12 h, verificamos uma menor taxa produção de blastocistos em relação ao grupo controle. No entanto, após a retirada do bloqueio por 6 h e maturação por 18 h um maior número de oócitos tratados tanto com ROS, como BL-I encontraram-se em MII. Da mesma forma, ao reduzirmos a dose e o tempo de inibição, os grupos tratados por 6 h de inibição meiótica e reversão por 18 h apresentaram taxas de produção embrionária similares ao grupo controle. No Experimento II, os oócitos permaneceram em meio MIV durante 6h na presença de 12,5 μM de ROS ou na presença de 50 μM de BL-I ou com a associação de ROS (6,25 μM) + BL-I (25 μM) sendo em seguida cultivados em meio MIV livre de fármacos por 18 h. Após esse tempo, os oócitos inibidos foram fertilizados, cultivados *in vitro* e os embriões produzidos foram submetidos a vitrificação. Os grupos BL-I e ROS + BL-I apresentaram superioridade de produção embrionária, tanto em relação ao grupo ROS como o controle. O grupo ROS + BL-I apresentou maior taxa de reexpansão pós-vitrificação. Além disso, os embriões dos grupos BL-I e ROS + BL-I apresentaram menor número de células apoptóticas quando comparados aos grupos controle e ROS. Concluiu-se que a utilização de BL-I e sua associação com ROS por 6 horas para o bloqueio da meiose em

bovinos foi eficiente em induzir uma melhora na produção bem como na qualidade embrionária. O Experimento III avaliou o estágio de maturação nuclear, a ultraestrutura oocitária, localização e expressão das proteínas ERK 1/2, p 34^{cdc 2}, ciclina B1 nos oócitos submetidos à inibição meiótica utilizando os fármacos ROS (12,5 µM) e BL-I (50 µM) por 6 h e reversão da inibição por 18 h. Os oócitos permaneceram em meio MIV durante 6 h na presença de de ROS ou na presença de 50 µM de BL-I ou com a associação de ROS (6,25 µM) + BL-I (25 µM) sendo em seguida cultivados em meio MIV livre de fármacos por 18 h. Oócitos foram então fixados, corados por imunofluorescência para visualização nuclear, localização e expressão das proteínas ERK1/2, ciclina B1 e p34^{cdc2} e preparados para avaliação da ultraestrutura por microscopia eletrônica. Observamos um menor número de oócitos do grupo controle em MI (C= 18,2 ± 5,4 %) e maior quantidade de oócitos degenerados no grupo ROS (16,3 ± 5,6 %). Maior quantidade de oócitos em MI após 24 horas de maturação nos grupos controle e ROS, sendo 8,3 ± 5,9 % e 6,8 ± 6,4 %, respectivamente. Apenas o grupo ROS bloqueado por 6 h apresentou baixa expressão por intensidade de fluorescência da proteína ERK1/2 no ooplasma. O grupo imaturo apresentou elevada expressão da proteína ciclina B1 e proteína p34^{cdc2} e foi detectada em todos os oócitos avaliados, como maior expressão nos imaturos e 6 h, apenas o ROS bloqueado apresentou menor expressão. Não ocorreu diferença na localização destas proteínas no ooplasma e não observamos alterações ultraestruturais oocitárias entre os tratamentos. Estes resultados demonstram que vários caminhos estão envolvidos na regulação da maturação meiótica oócitos bovinos. Alguns desses caminhos são independentes do MPF e, conseqüentemente, escapam do controle dos fármacos inibidores da CDK1, ROS e BL-I.

Palavras chave: roscovitina, butirolactona I, embriões, criopreservação, bovina

MAZIERO, R.R.D. **Effects of different inhibitions on meiotic *in vitro* maturation of bovine oocytes and subsequent tolerance of bovine embryos.** Botucatu, 2014. p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

This work had as main objective to investigate the effect of BL-I and ROS in temporarily blocking the resumption of meiosis, acting on the factors that control the meiotic cell cycle of bovine oocytes and expansion of *cumulus oophoros* cells. In Experiment I, the oocytes remained in IVM media for 6, 12 and 24h in the presence of two concentrations of ROS (12.5 μ M and 25 μ M) or in the presence of BL-I (50 μ to 100 mM) or the association of ROS (6.25 μ M) + BL-I (25 μ M) and then cultured in a drug-free IVM media for 18, 12 or 24 h. After this time, the inhibited oocytes by 6 or 12 h were fertilized and cultured *in vitro*. Treatment with ROS and BL-I did not result in delay in germinal vesicle breakdown in relation to control. However, when used for 24 h, higher rates of oocyte degeneration were found. When these drugs were used for 12 h with reversion for more than 12 h, a lower blastocyst production rate compared to the control group was verified. However, after removal of the blockage for 6 h and maturation for 18 h, a higher number of oocytes treated with both ROS and BL-I were found in MII. Similarly, when the dose and duration of inhibition were reduced, the groups treated for 6 h of meiotic inhibition and reversion for 18 h showed similar embryo production rates to the control group. In Experiment II, oocytes remained in IVM media for 6 h in the presence of 12.5 μ M of ROS or the presence of 50 μ M of BL-I or the association of ROS (6.25 μ M) + BL-I (25 μ M) and then cultured in drug-free IVM media for 18 h. After this time, the inhibited oocytes were fertilized *in vitro* and the produced embryos were submitted to vitrification. The BL-I and ROS + BL-I groups showed superiority in embryo production, both in relation to the control as ROS group. The ROS + BL-I group showed higher rate of re-expansion after vitrification. Additionally, embryos from BL-I and BL-I + ROS showed lower number of apoptotic cells when compared to control and ROS group. It was concluded that the use of BL-I and its association with ROS for 6 hours to meiosis block in cattle was effective in inducing an improvement in production as well as in embryo quality. The Experiment III evaluated the stage of nuclear maturation, oocyte ultrastructure, localization and

expression of ERK 1/2 proteins, p 34^{cdc2}, cyclin B1 in oocytes submitted to meiotic inhibition using ROS (12.5 μ M) and BL-I (50 μ M) for 6 h and reversion of inhibition for 18 h. The oocytes remained in IVM media for 6 h in the presence of ROS or the presence of 50 μ M of BL-I or in the association of ROS (6.25 μ M) + BL-I (25 μ M) and then cultured in a drug-free IVM media for 18 h. Oocytes were then fixed and stained by immunofluorescence for nuclear visualization, localization and protein expression of ERK 1/2, cyclin B1 and p34^{cdc2} and prepared for evaluation of the ultrastructure by electron microscopy. A lower number of oocytes in MI were observed in control group (C = 18.2 ± 5.4 %) and a higher amount of degenerated oocytes was observed in ROS group (16.3 ± 5.6 %). Higher amounts of oocytes in MI after 24 hours of maturation were observed in the control and ROS group, being 8.3 ± 5.9 % and 6.8 ± 6.4 %, respectively. Only the ROS group meiotic arrest for 6 h showed low expression in fluorescence intensity of ERK1/2 protein in the ooplasm. The immature group showed high expression of cyclin B1 and p34^{cdc2} proteins and it were detected in all evaluated oocytes, as higher expression in immature and 6 h, only the blocked ROS showed lower expression. There were no differences in the localization of these proteins in the ooplasm and it was not found any ultrastructural changes in oocyte between treatments. These results demonstrate that multiple pathways are involved in regulation of meiotic maturation of bovine oocytes. Some of these pathways are independent of MPF and consequently escape from control of inhibitory drugs of CDK1, ROS and BL-I.

Key words: roscovitine, butyrolactone I, embryos, cryopreservation, bovine

Capítulo 1

Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIV) tornou-se uma valiosa tecnologia de reprodução assistida em sistemas de criação bovina. Entretanto, mesmo com as notáveis inovações neste sistema, os maiores entraves para o pleno sucesso desta biotecnologia são os baixos índices de prenhez pós-transferência e a maior sensibilidade do embrião à criopreservação (LONG, 2008).

A criopreservação de embriões tem o potencial de disseminar as atuais tecnologias, por manter o metabolismo celular em estado de quiescência, tornando possível a conservação dos embriões por tempo indeterminado. Além de facilitar o transporte de embriões, a longas distâncias, nos casos de importações e exportações, a formação de bancos genéticos proporciona uma maior segurança zoonosológica durante a comercialização, uma vez que estes embriões, quando manipulados segundo as normas da Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS), podem evitar a disseminação de várias doenças.

Somente embriões de excelente qualidade sobrevivem ao processo de criopreservação. Assim, muitos laboratórios buscam melhorar o potencial de desenvolvimento e a qualidade do oócito, durante a maturação *in vitro* (MIV), pois se trata de uma etapa crucial e limitante para o sucesso da PIV. A eficiência da tecnologia de MIV refere-se ao estado bioquímico e molecular do oócito maturocapaz de ser fertilizado naturalmente e desenvolver um embrião, que ao ser transferido, desenvolverá a termo (GILCHRIST e THOMPSON, 2007).

Um dos procedimentos para o aprimoramento da MIV consiste na inibição da maturação meiótica (nuclear) promovendo, ao mesmo tempo, o desenvolvimento do ooplasma (TRIPATHI et al., 2010; BILODEAU-GOESEELS, 2012). A maturação espontânea do oócito, que ocorre quando este é retirado do ambiente folicular, pode ser evitada pelo uso de inibidores das quinases dependentes de ciclina específicos (CDK), como a butirolactona I (BL-I) e a roscovitina (ROS), as quais inibem a atividade do fator promotor da maturação (MPF) (GILCHRIST, 2008). Embora tal procedimento resulte, na maioria das vezes, em desenvolvimento similar a oócitos não tratados, este mecanismo tem se prestado como importante ferramenta para a pesquisa do desenvolvimento e da diferenciação do oócito (SIRARD, 2001).

O MPF e a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) são os principais fatores reguladores da maturação e suas atividades são direta (MPF) e indiretamente

(MAPK) afetadas por tais inibidores de quinases dependentes de ciclina (CDK) (KUBELKA et al., 2000). O controle do ciclo celular meiótico depende das proteínas que constituem o MPF, a p34^{cdc2} e a ciclina B1, e também da MAPK, representada pelas proteínas p44 e p42 (ERK1 e ERK2). Além disso, a localização específica dessas proteínas no citoplasma celular parece estar envolvida no controle de suas atividades durante o ciclo celular em oócitos e embriões (QUETGLAS et al., 2011).

Para tanto, com a necessidade de se buscar uma metodologia de PIV mais adequada e eficiente, a utilização de fármacos inibidores da maturação nuclear facilita o manejo dos oócitos para o uso em programas comerciais de produção de embriões *in vitro*, uma vez que permite o transporte, bem como a sincronização do momento da fertilização de oócitos de diferentes animais. Ademais, com a melhora nas taxas de produções de embriões, as técnicas de estocagem em nitrogênio líquido, principalmente a vitrificação deixariam de ser um desafio para a aplicação prática da técnica de PIV.

Objetivos Gerais

O objetivo geral deste estudo foi avaliar os efeitos da adição de inibidores da meiose oocitária, sobre o desenvolvimento embrionário e criotolerância. Para tanto, foram realizados três experimentos:

- Experimento I:

Avaliar o índice de apoptose celular de embriões oriundos de oócitos maturados *in vitro* com butirolactona I e/ou roscovitina, em diferentes concentrações e tempos de exposição.

- Experimento II:

Vitrificar/desvitrificar os embriões produzidos *in vitro* após a adequação da dose e do tempo de inibição da meiose oocitária, avaliar as taxas de reexpansão e de apoptose celular dos embriões.

- Experimento III:

Avaliar os oócitos imaturos, controle e submetidos à inibição meiótica, quanto aos efeitos da utilização destes fármacos, nos fatores promotores da maturação oocitária, bem como a sua ultraestrutura.

Objetivos Específicos

- Experimento I:

1- Avaliar a resposta dos oócitos, inibidos por 24 horas com roscovitina (ROS) na concentração de 25 μM ; butirolactona I (BL-I) na concentração de 100 μM ; e em seguida, maturados em MIV por 24 horas a partir do estágio de desenvolvimento meiótico do núcleo (maturação nuclear).

2- Avaliar a resposta dos oócitos, inibidos por 6 horas com roscovitina (ROS) na concentração de 12,5 μM ; butirolactona I (BL-I) na concentração de 50 μM e a associação da roscovitina (ROS 6,25 μM) + butirolactona I (BL-I 25 μM); e em seguida, maturados em MIV por 18 horas a partir do estágio de desenvolvimento meiótico do núcleo (maturação nuclear).

3- Avaliar a resposta dos oócitos, inibidos por 12 horas com ROS na concentração de 12,5 μM ; BL-I na concentração de 50 μM e a associação da ROS 6,25 μM + BL-I 25 μM ; e em seguida, maturados em MIV por 12 horas a partir do estágio de desenvolvimento meiótico do núcleo (maturação nuclear).

4- Produzir embriões *in vitro* e avaliar os índices de apoptose celular, utilizando ROS na concentração de 12,5 μM ; BL-I na concentração de 50 μM e a associação da ROS 6,25 μM + BL-I 25 μM ; por 6 horas durante a MIV e em seguida, maturados em MIV livre de fármaco por 18 horas.

5- Produzir embriões *in vitro* e avaliar o índice de apoptose celular dos embriões sem adição de fármaco, utilizando ROS na concentração de 12,5 μM ; BL-I na concentração de 50 μM e a associação da ROS 6,25 μM + BL-I 25 μM por 12 horas durante a MIV e em seguida, maturados em MIV livre de fármaco por 12 horas.

- Experimento II:

1- Avaliar a taxa de clivagem (D3), taxa de formação de blastocistos (B1) produzidos *in vitro* no D6 (dia seis) e D7 (dia sete), a partir de oócitos que foram maturados sem adição de fármacos; inibidos por 6 horas com ROS (12,5 μM), BL-I (50 μM) e ROS 6,25 μM + BL-I 25 μM na MIV seguidos da maturação por 18 horas livre desses agentes.

2- Avaliar a taxa de sobrevivência dos blastocistos PIV após a vitrificação e aquecimento por meio da taxa de reexpansão dos diferentes grupos experimentais.

3- Avaliar o número total de células íntegras e a ocorrência de apoptose por meio da técnica TUNEL com os embriões frescos e aquecidos oriundos dos diferentes grupos experimentais.

- Experimento III:

1- Avaliar a resposta dos oócitos sem adição de fármaco, inibidos por 6 horas com ROS na concentração de 12,5 μM , BL-I na concentração de 50 μM ; associação de ROS 6,25 μM + BL-I 25 μM ; e em seguida, maturados em MIV por 18 horas a partir do estágio de desenvolvimento meiótico do núcleo (maturação nuclear).

2- Avaliar a ultraestrutura da organização e localização das organelas presentes em oócitos a partir da microscopia eletrônica de transmissão nos diferentes grupos experimentais: controle, ROS 12,5 μM , BL-I 50 μM e ROS 6,25 μM + BL-I 25 μM .

3- Avaliar o efeito do bloqueio da meiose de oócitos bovinos com os inibidores de CDK ROS, BL-I e a associação de ROS + BL-I sobre a expressão das proteínas ERK 1/2, p 34^{cdc 2}, ciclina B1.

4- Avaliar o efeito do bloqueio da meiose de oócitos bovinos com os inibidores de CDK ROS, BL-I e a associação de ROS + BL-I sobre a localização das proteínas ERK 1/2, p 34^{cdc 2}, ciclina B1.

Hipóteses

Experimento I:

A hipótese levantada é que a adição dos fármacos inibidores da meiose oocitária roscovitina (ROS), butirolactona I (BL-I) e ROS + BL-I durante a MIV irá sincronizar a maturação nuclear e a citoplasmática que ocorrem de forma assincrônica. Desta forma, tornará os oócitos aptos à fecundação e ao cultivo *in vitro* embrionário e aumentará a taxa de produção de embriões bovinos com um índice de apoptose reduzido.

Experimento II:

A adição dos fármacos inibidores da meiose oocitária durante a MIV influenciará positivamente na PIV de embriões bovinos e aumentará a resistência dos embriões aos processos de vitrificação com uma maior taxa de reexpansão pós-desvitrificação e diminuição dos índices de apoptose celular nos embriões criopreservados.

Experimento III:

A hipótese levantada é que a utilização dos inibidores de CDK: ROS e BL-I irão bloquear a ação dos fatores promotores da maturação nuclear oocitária pela expressão das proteínas ERK, p34^{cdc2} e ciclina B1. No entanto, este bloqueio não irá influenciar negativamente na morfologia oocitária.

Revisão de Literatura

1. Maturação oocitária

A maturação dos oócitos é um processo longo, durante o qual as células adquirem capacidade intrínseca para desenvolvimento gradual, até alcançar a ativação do genoma embrionário (FERREIRA et al., 2009a). Em humanos, a MIV é uma alternativa à estimulação ovariana, realizada no tratamento de infertilidade. No entanto, a qualidade e o potencial de desenvolvimento do embrião maturado, tem sido inferior àqueles maturados *in vivo*. Para tanto, exige-se uma sincronização entre a maturação nuclear e a citoplasmática (SHU et al., 2008).

Este processo complexo e distinto, envolve a maturação nuclear e citoplasmática, sendo a maturação nuclear uma segregação cromossômica e a citoplasmática uma reorganização de organelas, armazenamento de mRNA e transcrição de proteínas para que aconteçam a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial (PONDERATO et al., 2001; FERREIRA et al., 2009a).

Nos seres humanos, um pequeno folículo antral demora vários dias para ser maturado e assim adquirir o tamanho final de um folículo pré-ovulatório (14 mm) (BRANIGAN e ESTES 2005). No entanto, os folículos antrais recuperados para MIV sofrem um período substancialmente menor de crescimento para a fertilização *in vitro* convencional (CHA et al., 2000; SMITH et al., 2000; CEKLENIK et al., 2001), sendo assim um curto período para o desenvolvimento de oócitos inclusos. Isto ocorre devido à falta de estímulo para superar os efeitos inibitórios que as substâncias do fluido folicular e das células da granulosa causam em oócitos maturados *in vitro*, promovendo a maturação precoce, sem a aquisição de competência citoplasmática (GILCHRIST e THOMPSON, 2007).

Embora os oócitos imaturos de mamíferos possam retomar a meiose após o isolamento a partir de folículos antrais (EDWARDS et al., 1965), a maturação citoplasmática acontece de forma assíncronica em relação a nuclear (JANSSENSWILLEN et al., 1995; HUANG et al., 1999). É necessário então, submeter o oócito imaturo há um tempo maior de maturação citoplasmática para que ele possa adquirir uma maior competência para o desenvolvimento *in vitro* (WU et al., 2006).

Assim, apesar do mecanismo de maturação de oócitos *in vivo* e *in vitro* ainda ser pouco esclarecido, normalmente é aceito que o segundo mensageiro monofosfato cíclico

de adenosina (cAMP) desempenha um papel crítico na manutenção do bloqueio meiótico de oócitos mamíferos. Um relativo aumento no nível de cAMP dentro o oócito é essencial para manter o bloqueio da meiose, enquanto que uma queda na concentração intraoócito de cAMP permite a retomada da meiose (SELA-ABRAMOVICH et al., 2006). Dessa forma, a concentração intraoócito de cAMP é regulada pelo equilíbrio da atividade de dois tipos de enzimas: adenilato ciclase (AC) e fosfodiesterases (PDEs), que são responsáveis pela síntese e degradação de cAMP, respectivamente (FIMIA e SASSONE-CORSI, 2001; CONTI et al., 2002).

Depois de ser sintetizada por AC nas células do *cumulus*, o cAMP é transferido para o oócito pelas junções gap comunicantes (JGC). Deste modo, subtipos específicos PDEs são capazes de interferir na maturação meiótica espontânea em oócitos de murinos (NOGUEIRA et al., 2003a), bovinos (AKTAS et al., 1995; LUCIANO et al., 2004), suínos (FUNAHASHI et al., 1997; BAGG et al., 2006) e oócitos humanos (NOGUEIRA et al., 2003b, 2006) e estando localizados nos compartimentos foliculares de células somáticas e germinativas, com a PDE4 envolvida principalmente no metabolismo de cAMP nas células da granulosa e a PDE3 nos oócitos (CONTI et al. 2002; SASSEVILLE et al., 2006).

Evidências indicam que o contato íntimo célula a célula pelas junções gap é fundamental para a conclusão da maturação meiótica e citoplasmática (GILCHRIST e THOMPSON, 2007). As junções gap fornecem nutrientes essenciais e suporte metabólico para os oócitos, ao mesmo tempo fornece substâncias inibidoras da meiose, como o cAMP, purinas e outras moléculas regulatórias que mantêm o bloqueio da meiose (JAMNONGJIT e HAMMES, 2005).

In vivo, o pico de LH desencadeia a ruptura das junções gap entre o oócito e as células da granulosa no folículo pré-ovulatório (EPPIG, 1991a). O isolamento dos oócitos imaturos antes que ocorra a MIV pode interromper a transferência de nutrientes e suporte metabólico essencial para a conclusão da maturação, resultando na ativação precoce de maturação nuclear e posterior comprometimento de desenvolvimento do ooplasma. Por este motivo, é essencial a manutenção da integridade das junções gap comunicantes, entre as células foliculares e o oócito durante a MIV (CARABATSOS al., 2000).

Assim, os oócitos são submetidos a várias alterações ultraestruturais antes da maturação. Estas modificações têm sido denominadas de capacitação do oócito e este evento é de fundamental importância para sua competência (HYTTEL et al., 1997).

Além dessas alterações morfológicas, a aquisição de competência para o desenvolvimento parece ocorrer durante este período de maturação (BLONDIN et al., 1997).

In vitro, a retomada da meiose ocorre quando há liberação do fator de inibição a partir do folículo (KOTSUJI et al., 1994). No entanto, o resultado da maturação *in vitro* na produção de embriões é reduzido, sugerindo que nem todos os oócitos têm a capacidade de amadurecer devidamente, pois alguns oócitos são capacitados, sem retomar a meiose (HYTTEL et al., 1997).

1.1 Maturação nuclear

A maturação nuclear compreende o processo de reversão do primeiro bloqueio meiótico do oócito em vesícula germinativa (VG) até o segundo bloqueio meiótico em metáfase II (MII). Inicia-se no momento em que ocorre a retomada da meiose a partir do estágio de diplóteno da prófase I, marcada pela condensação dos cromossomos e rompimento da vesícula germinativa (QVG), ou seja, do envelope nuclear. Após a QVG, o oócito passa pelo estágio de diacinese, metáfase I (MI), anáfase I (AI) e telófase I (TI), completando a primeira divisão meiótica, e então, rapidamente, passa para a MII da segunda divisão meiótica, quando há novo bloqueio do ciclo celular (segundo bloqueio meiótico; KUBELKA et al., 2000).

Ao longo deste processo, os cromossomos homólogos ($2n$) são divididos em dois grupos, com a metade do número original de cromossomos. Ao término da primeira divisão meiótica, o citoplasma é dividido assimetricamente, gerando duas células de tamanhos diferentes: uma pequena chamada de corpúsculo polar e outra grande, o oócito secundário. Cada uma das células contém a metade do número de cromossomos da espécie. Ao término da maturação nuclear, o oócito permanece neste estágio do ciclo celular (MII) até a fecundação ou ativação partenogenética (QUETGLAS et al., 2011).

Após o espermatozóide penetrar no oócito, ocorre a extrusão do segundo corpúsculo polar, os pro-núcleos da fêmea e do macho se formam e ocorre a singamia iniciando o desenvolvimento embrionário. Mudanças nucleares durante a maturação e fertilização ocorrem e são coordenados por meio dos movimentos do material genético e das organelas e por meio de mudanças bioquímicas no citoplasma para garantir o desenvolvimento normal dos embriões (VAN BLERKOM, 1991).

O ciclo celular mitótico e meiótico é controlado pela atividade do fator promotor da fase M ou fator promotor da maturação (MPF) que é composto pela quinase catalítica *cdc2* e pela subunidade regulatória ciclina B (BILODEAU-GOESEELS, 2012). O folículo ovariano contém fatores inibitórios indefinidos que mantêm o oócito bloqueado. O principal fator inibitório das paredes foliculares *in vitro*, segundo Richard e Sirard (1996), encontra-se nas células da teca e é liberado no meio de cultivo.

A interrupção da comunicação *cumulus-oócito* após estímulo pelas gonadotrofinas pode levar a diminuição da concentração de cAMP no interior do oócito, podendo assim, ocorrer a retomada da meiose, mostrando que o cAMP funciona como regulador da maturação nuclear em oócitos de mamíferos (BILLIG et al., 1988).

Para ocorrer o bloqueio da meiose, o receptor da proteína G (GPR3) ativa a proteína G a estimular a adenilato ciclase (AC) para sintetizar a cAMP. O agente bloqueador eleva os níveis de cAMP tornando a proteína quinase (PKA) ativa. Assim, esta proteína inativará a quinase catalítica *cdc2* mantendo o MPF inativo e o núcleo em estágio de VG (BILODEAU-GOESEELS, 2012) (Figura 1 A).

O contrário ocorre no processo normal da maturação, em que a GPR3 ativa a proteína G a estimular a AC. Como os níveis de cAMP estarão diminuídos, ocorrerá uma inativação da PKA e ativação da quinase catalítica *cdc2* e da subunidade regulatória ciclina B. Consequentemente ocorrerá uma ativação do MPF causando a QVG e a maturação (BILODEAU-GOESEELS, 2012) (Figura 1 B).

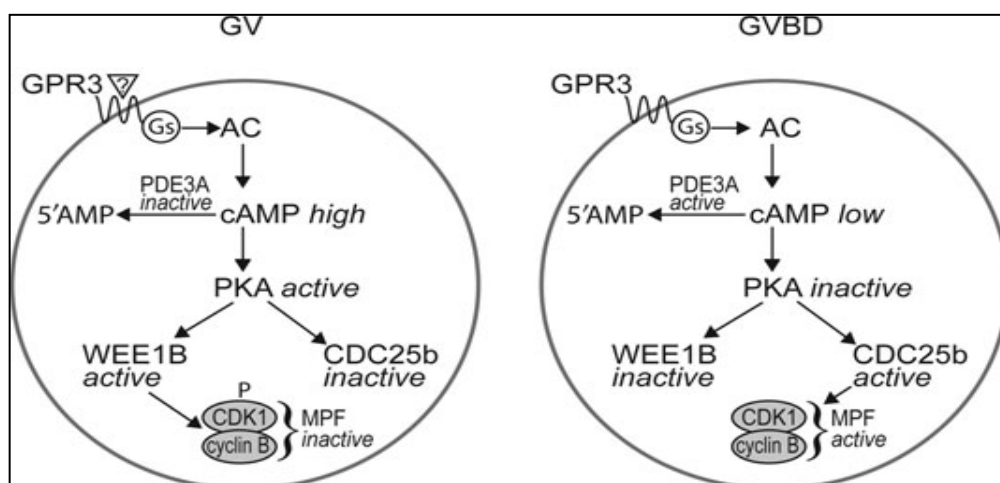


Figura 1: Esquema ilustrando os eventos do bloqueio e reinício da meiose oocitária. **A:** evento ocorrido durante o bloqueio da meiose, com o núcleo em estágio de vesícula germinativa (VG). **B:** evento normal da meiose oocitária, onde há uma diminuição nos níveis de cAMP, ativação do fator promotor de maturação (MPF), quebra da vesícula germinativa (QVG) e maturação oocitária (BILODEAU-GOESEELS, 2012).

Outro segundo mensageiro, o cGMP, induzido pelo óxido nítrico (NO) ou por peptídeos natriuréticos, também medeia funções na retomada da meiose de oócitos de mamíferos. O efeito do cGMP nas células pode ser mediado pela regulação da atividade de algumas fosfodiesterases (PDE2, PDE3 e PDE5) ou estimulação das PKGs. Altas concentrações de cGMP também podem afetar de forma indireta a atividade das PKAs. A ação de fosfodiesterases específicas que hidrolisam o cGMP e a ação de inibidores que controlam a comunicação das gap junctions geram a estabilização do nível de cGMP nas células somáticas, o que é essencial para a manutenção do bloqueio meiótico (SCHWARZ et al., 2008).

Os níveis de cGMP são balanceados entre a síntese de guanilato ciclase (GC) e degradação por PDE-cGMP específicas (PDE5, PDE6, PDE9). Guanilato ciclase solúvel (GC) é uma proteína heterodimérica composta pelas subunidades reguladas por estrogênios, compostos que elevam o cAMP. A função da GC é afetada não somente pelo NO, mas igualmente pela regulação da expressão de subunidades de GC em nível transcricional e pós-transcricional (PAPAPETROPOULOS et al., 1996).

As fosfodiesterases são enzimas intracelulares que catalizam especificamente a hidrólise dos segundos mensageiros cíclicos cAMP e cGMP. Algumas PDEs que tem sua atividade sobre a degradação do cAMP e são controladas pelos níveis de cGMP resultam num caminho de duas vias entre o cGMP e cAMP. A regulação diferencial de cada. A regulação diferencial de cada isoforma de PDEs em diferentes compartimentos do complexo *cumulus oophorus* estão envolvidas no controle dos níveis de cAMP e, conseqüentemente, na maturação (LIANG et al, 2005).

A maturação nuclear pode ser avaliada diretamente pela configuração cromossômica e classificados em diferentes estádios (Figura 2; LANDIM-ALVARENGA, 1999):

- **Vesícula germinativa (VG):** caracterizada pela presença de núcleo esférico e definido com carioteca íntegra e filamentos de cromatina descondensados;

- **Quebra da vesícula germinativa (QVG):** caracterizada pela cromatina condensada e ausência de membrana nuclear visível;

-**Metáfase I (MI):** em que os cromossomos estão arranjados na placa metafásica e localizados periféricamente no ooplasma;

- **Metáfase II (MII)** caracterizado pela presença de cromossomos metafásicos na periferia do ooplasma e pela extrusão do primeiro corpúsculo polar, representado por um grupo denso de cromossomos.

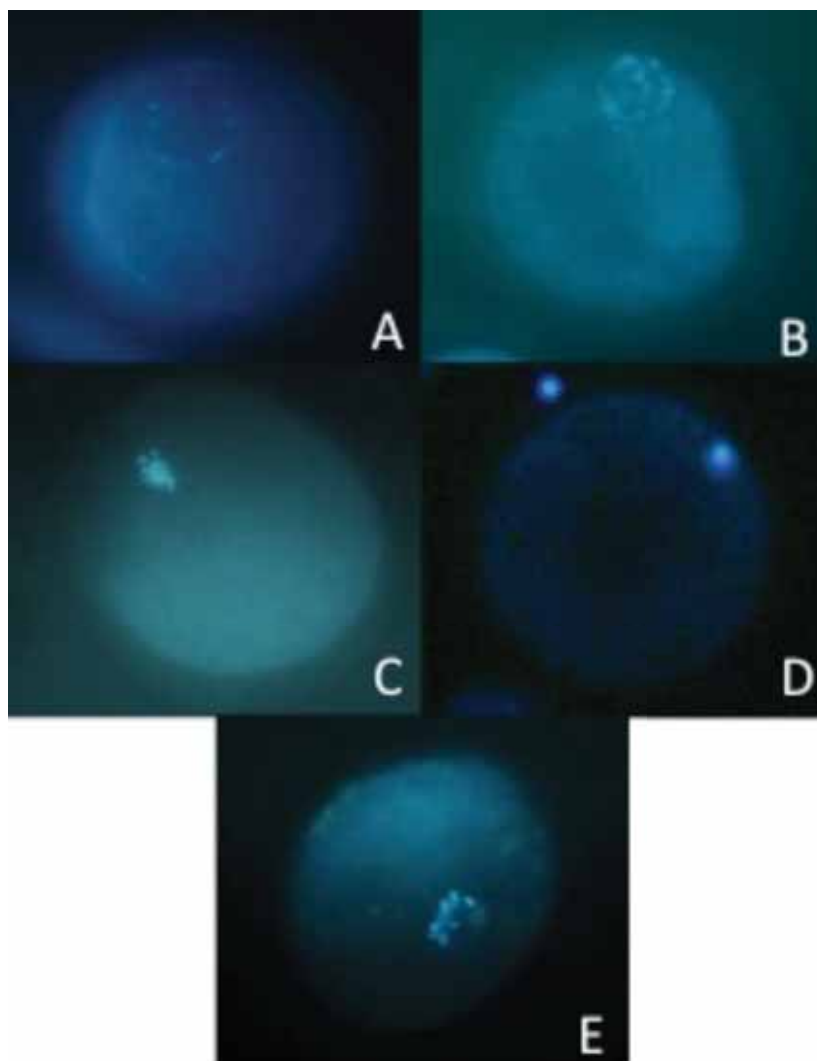


Figura 2: Apresentação fotográfica da avaliação dos estágios nucleares dos oócitos dos grupos experimentais em microscópio invertido com luz fluorescente ultravioleta. Após a coloração com Hoechst 33342 os oócitos foram classificados em: Vesícula Germinativa (VG); Quebra da Vesícula Germinativa (QVG); Metáfase I (MI); Metáfase II (MII) e Degenerado ou Não Identificado (D/NI). Aumento de 400x.

1.2 Maturação citoplasmática

Além da progressão da meiose, que caracteriza morfológicamente a maturação do oócito e que por si só não garante o desenvolvimento embrionário futuro, o mesmo sofre alterações em seu citoplasma, denominada maturação citoplasmática (FERREIRA et al., 2009).

A maturação citoplasmática compreende as mudanças estruturais e moleculares que ocorrem no citoplasma do oócito no estágio de VG até o fim da MII. A avaliação

dessa maturação pode ser feita indiretamente, pela habilidade do oócito maduro em clivar e desenvolver-se a blastocisto, após a fecundação ou a ativação partenogénica. Outros parâmetros morfológicos indiretos como a expansão das células do *cumulus* (CCs), a velocidade de extrusão do primeiro corpúsculo polar e aumento do espaço perivitelínico, também podem ser utilizados para a avaliação da maturação citoplasmática (KRUIP et al., 1983).

As modificações ultraestruturais dizem respeito a uma reorganização citoplasmática, em que a maioria das organelas migra pelos microtúbulos e microfilamentos. As mitocôndrias e o complexo de Golgi, que se localizam mais periféricamente no oócito imaturo, migram e se distribuem numa posição perinuclear. Os grânulos corticais, produzidos pelo complexo de Golgi e situados originalmente no centro do oócito, migram para a periferia do mesmo e ancoram-se na membrana citoplasmática (CRAN e ESPER, 1990).

1.2.1 Redistribuição das organelas citoplasmáticas

O reposicionamento das organelas citoplasmáticas depende da necessidade da célula em cada fase de seu desenvolvimento e ocorre por ação de microfilamentos e microtúbulos do citoesqueleto.

Assim, mitocôndrias, ribossomos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e grânulos corticais, assumirão diferentes posições das observadas em estágio de VG (FERREIRA et al., 2009a).

Mitocôndrias

A ativação de determinadas vias metabólicas, pela síntese de proteínas e pela fosforilação é indispensável para a maturação citoplasmática. Dentro deste contexto, as mitocôndrias têm um papel extremamente importante uma vez que são componente chave do metabolismo energético (KRISHER et al., 1998; MEIRELLES et al., 2004). O movimento das mitocôndrias para áreas com alto consumo de energia acontece em oócitos e embriões nos períodos críticos do ciclo celular.

Estudos mostram que durante a maturação, as mitocôndrias sintetizam a adenosina trifosfato (ATP) necessária para a síntese de proteínas e posterior desenvolvimento do embrião (MEIRELLES et al., 2004). A análise ultraestrutural de oócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro* (MIV) mostra que as mitocôndrias

passam de uma posição mais periférica para uma distribuição dispersa por todo o citoplasma, após 12 a 18 horas de cultivo (HYTTEL et al., 1986).

Este evento é semelhante ao que ocorre *in vivo*, o que implica na distribuição mais periférica antes do pico de hormônio luteinizante (LH) e posterior formação mais cortical nas fases finais de maturação nuclear e novamente uma distribuição dispersa após a extrusão do corpúsculo polar, aproximadamente 19 horas após o pico de LH (KRUIP et al., 1983; HYTTEL et al., 1997).

Estudos sobre oócitos bovinos e murinos correlacionam a reorganização das mitocôndrias nos oócitos após a MIV, assim como os níveis totais de ATP nos embriões. Assim, embriões com menos ATP no citoplasma apresentam desenvolvimento mais lento e um menor número de células (LIU et al., 2000).

Antes da ativação do genoma embrionário, 72 horas em cultivo, as mitocôndrias apresentam níveis intermediários de atividade, fato que pode ser explicado pela proteção adaptativa contra as espécies reativas de oxigênio (EROs), como resultado do metabolismo mitocondrial. Esta proteção é fornecida por moléculas catalisadoras, como a glutatona e as peroxidases, as quais são produzidas durante a maturação do oócito e desenvolvimento embrionário (KRISHER, 2004).

Assim, se a atividade mitocondrial é elevada durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, os embriões provavelmente não sobreviveriam, pois seriam incapazes de eliminar a produção excessiva de EROs nestes processos. Após o início da transcrição do genoma embrionário, a atividade mitocondrial diminui e deste modo, o embrião começa a utilizar outras vias metabólicas para produzir energia, tais como a glicólise anaeróbia.

Além das atividades descritas, as mitocôndrias regulam o processo de apoptose celular, agindo como reservatórios de proteínas ativadoras e efetoras do processo de morte celular programada (MCP), como por exemplo, do citocromo c; e uma permeabilização da membrana mitocondrial acarretará na liberação deste, com consequente ativação da cascata do processo de apoptose e consequentemente morte celular (PARONE, 2002).

Retículo Endoplasmático

As membranas do retículo endoplasmático (RE) são fisiologicamente ativas, interagem com o citoesqueleto e contém diferentes domínios especializados em diferentes funções. Dentre as funções conhecidas do RE estão o dobramento de

proteínas e sua degradação, metabolismo lipídico, compartimentalização do núcleo, interferência no gradiente de íons cálcio (Ca^{2+}) e a síntese de membrana (FERREIRA et al., 2009a).

Ao armazenar e liberar cálcio, o sistema desempenha um papel importante na sinalização intracelular. Os mecanismos envolvidos no remodelamento e nas vias de atividade do cálcio apontam a importância destes íons (Ca^{2+}) em vários eventos.

As vias de sinalização Ca^{2+} dependem das diferenças entre os níveis intra e extracelulares, os quais geram diferentes gradientes de concentrações entre os dois compartimentos. Este gradiente é regulado pelo potencial de membrana do ooplasma (LIPPINCOTT-SCHWARTZ et al., 2000).

Foi demonstrado que em oócitos de roedores e humanos, os íons (Ca^{2+}) das lojas citoplasmáticas são mediados pelo íon ligante de canais, como o receptor inositol 1,4,5 trifosfato (IP3R) e o receptor rianodina, ambos localizados na membrana RE, responsáveis pelo controle da liberação de Ca^{2+} para o citosol. Estabeleceu-se que a liberação de Ca^{2+} via IP3 e do seu receptor, IP3R, é essencial para a ativação dos oócitos durante a fertilização (KLINE e KLINE, 1994).

Mudanças bioquímicas e estruturais no RE durante maturação são fundamentais para o bom funcionamento da regulação do cálcio intracelular. Na análise *in vivo* dos oócitos de camundongo, no estágio de vesícula germinativa (VG), observou-se que o RE é uniformemente distribuído no ooplasma. Assim como em outras espécies, o RE é encontrado na região cortical e se acumula em pequenas porções de 1-2 μm em todo o citoplasma ao progredir o desenvolvimento até o estágio de MII (STRICKER, 2006).

A sensibilidade do sistema para liberar o cálcio aumenta após a maturação. Durante a fecundação, a entrada do espermatozóide no oócito provoca a saída do cálcio do retículo, seguido pelo início do desenvolvimento embrionário. No momento da formação do segundo corpúsculo polar, as porções de REs começam a desagregar, sendo aproximadamente 3 a 4 horas após a inseminação e 2 horas antes da sinalização do cálcio para deixar a fase de desenvolvimento pró-nuclear (FERREIRA et al., 2009a).

Complexo de Golgi (CG)

O Complexo de Golgi é constituído por dobras e vesículas circulares achatadas e vesículas esféricas de diversos tamanhos que parecem originar das primeiras. Localiza-se em posições constantes, quase sempre ao lado do núcleo. Uma de suas principais funções consiste na separação e endereçamento das moléculas sintetizadas nas células,

encaminhando-as para as vesículas de secreção, para os lisossomos ou para a membrana celular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2000).

Durante a maturação e a fertilização dos mamíferos, a dinâmica das membranas do Golgi ainda necessita de maiores informações para poder ser compreendido. Sabe-se que em oócitos bovinos, no estágio de VG, encontram-se fragmentos de CG que se transformam em vesículas durante a QVG (HYTTEL et al., 1986; MORENO et al., 2002; FERREIRA et al., 2009).

Grânulos corticais

Os grânulos corticais (CG) são derivados do Complexo de Golgi. A exocitose dos GCs envolve os filamentos do citoesqueleto e proteínas homólogas. No estágio de VG, os grânulos corticais estão agrupados ao longo do citoplasma. No final do período de maturação, quando estas atingem a fase de oócitos MII, os grânulos estão distribuídos próximos a superfície interna da membrana. Este é um padrão estratégico a fim de estarem dispostos para aguardar a entrada do espermatozóide e ativação oocitária (HOSOE e SHIOYA, 1997).

Os grânulos corticais são organelas exclusivamente encontradas em oócitos e sua composição inclui uma população diversa de proteínas, moléculas estruturais e enzimas e glicosaminoglicanos. A exocitose dos grânulos corticais (reação cortical) é um dos mecanismos mais comumente utilizado pelos oócitos a fim de evitar polispermia. Se a fecundação com mais de um espermatozóide ocorre, o zigoto resultante sofre uma clivagem anormal e se torna inviável, e eventualmente degenera já no início das divisões mitóticas (HOSOE e SHIOYA, 1997).

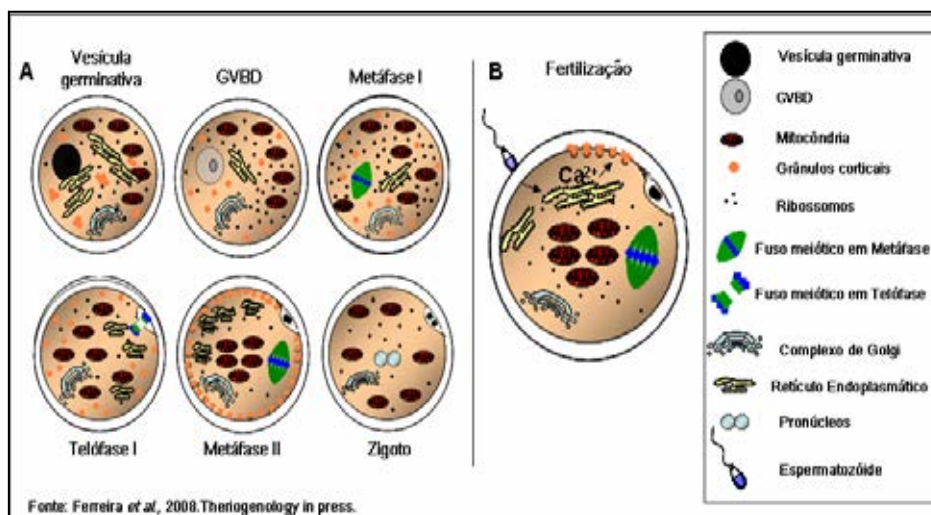


Figura 3: Esquema da distribuição das organelas citoplasmáticas durante a maturação, fertilização e formação do zigoto bovino. **A:** progressão da maturação nuclear e movimentação das organelas citoplasmáticas, desde o estágio de vesícula germinativa (VG) até a metáfase II (MII) e estágio de formação do embrião. **B:** distribuição das organelas, disposição dos grânulos corticais (GC) e fecundação do espermatozóide (FERREIRA et al., 2009a).

1.3 Maturação molecular

A maturação molecular envolve várias etapas como a transcrição, estoque e processamento de mRNA que serão traduzidos em proteínas pelos ribossomos, as quais influenciam diretamente no processo de maturação e eventos celulares subsequentes, tais como fertilização, formação de pronúcleos e fase inicial da embriogênese (TRIPATHI et al., 2010).

A transcrição e estoque de mRNA ocorre durante a folículo gênese, enquanto o núcleo encontra-se quiescente e cessa quando ocorre a retomada da meiose, uma vez que os cromossomos tornam-se condensados e inativos. Em contrapartida, a capacidade de tradução do mRNA e síntese proteica se mantém ao longo de todo o desenvolvimento oocitário e embrionário (SIRARD, 2001).

A maior parte do mRNA apresenta-se no ooplasma em sua forma estável, porém inativada caracterizada pela presença da cauda poli-A curta. Sob a ação de sinais específicos gerados durante a maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial ocorre a poliadenilação, ou seja, a adição de adeninas à porção terminal 3' do mRNA, por ação da enzima poli-a polimerase, com consequente liberação de moléculas repressoras acopladas à porção 5', permitindo o início da tradução do mRNA e síntese proteica (GOTTARDI e MINGOTI, 2009).

O processo de poliadenilação é iniciado no núcleo e o transporte do mRNA para o citoplasma é feito pelo encurtamento característico da cauda poli-A que, ao alcançar tal compartimento, torna-se menor no tamanho e heterogêneo. Adicionalmente, quando as moléculas de mRNA possuem caudas poli-A curtas, elas não são efetivamente traduzidas e a deleção dessa sequência é um passo inicial do processo de degradação (TOMEK et al., 2002).

O prolongamento citoplasmático da cauda poli-A está relacionado à ativação da tradução, isto é, a adição de adenina ao mRNA no citoplasma do oócito durante a maturação, leva à tradução das proteínas, e a deadenilação, a qual leva à degradação desse mRNA (FERREIRA et al., 2009a).

Assim, a eficiência do armazenamento e reativação oportuna dos mRNAs, regulados pelo processo de poliadenilação, determinam a competência do oócito para suportar os posteriores estágios do desenvolvimento. O aumento pronunciado da atividade das quinases inicia uma complexa cascata de fosforilação e desfosforilação de proteína específica (GOTTARDI e MINGOTI, 2009).

As quinases dependentes de ciclinas (CDKs) são uma família de serina/treonina quinases envolvidas na regulação do ciclo celular (CDK1, 2, 3, 4, 6 e 7), na transcrição (CDK7, 8 e 9) ou na função neuronal (CDK5). A atividade da CDK é dependente da interação com uma ciclina, cujos níveis são regulados sequencialmente para assegurar que as fases do ciclo celular prossigam na ordem correta (KUBELKA et al., 2000).

Exemplos importantes de quinases são o fator promotor de maturação (MPF) e a família da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK). Os oócitos em crescimento desenvolvem primeiramente a habilidade de ativar o MPF e, posteriormente, de ativar a via MAPK. Somente os oócitos com o crescimento completo possuem competência para ativar efetivamente as duas vias do ciclo celular (GOTTARDI e MINGOTI, 2009).

Proteína Quinase Ativada por Mitógenos (MAPKs)

Um dos grupos de proteínas que estão envolvidos na progressão da meiose são as MAPKs, pertencentes à família das serina/treonina quinases. Essas proteínas são ativadas por sinais extracelulares e, por esta razão, a MAPK também é chamada de ERK (quinase regulada por sinal extracelular – suas variantes, ERK1/2 – p44/p42 kDa; KUBELKA et al., 2000; BILODEAU-GOESEELS, 2012).

A ampla faixa de atuação das MAPKs é mediada por fatores de crescimento e por soro, com uma ativação menor pelo estresse, pelo efeito osmótico e pela

desorganização dos microtúbulos. Assim, também está relacionada à fosforilação de diversos substratos, incluindo fosfolipases, fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto. As MAPKs também catalisam a fosforilação e a ativação de diversas proteínas quinases, denominadas de proteínas quinases ativadas pelas MAPKs, que representam um adicional enzimático de vários espectros em diferentes células (KUBELKA et al., 2000; BILODEAU-GOESEELS, 2012).

A via MAPK é ativada durante a maturação meiótica em oócitos de vertebrados. A ativação da MAPK em oócitos bovinos ocorre após oito horas de cultivo *in vitro* e apresenta um aumento gradual até 12-14 horas, mantendo-se estável até o final da maturação (KUBELKA et al., 2000; QUETGLAS et al., 2011). As duas principais isoformas (ERK1/2) da MAPK são ativadas com a proximidade do rompimento da VG em oócitos bovinos (KUBELKA et al., 2000; QUETGLAS et al., 2011).

Isso sugere que a MAPK não é requerida para o reinício da meiose, mas é essencial em eventos pós-rompimento da VG. Porém, a injeção de MAPK ativa em oócitos de suíno ou de bovino induz ao rompimento da VG, indicando que essa proteína promove o reinício da meiose em condições especiais (KUBELKA et al., 2000; PONDERATO et al., 2001).

A MAPK está presente tanto no oócito, no qual é ativada pela proteína quinase MOS, quanto nas células do *cumulus*, as quais são ativadas pelas quinases RAS/RAF. Em ambas as células, a MAPK é ativada pela fosforilação dos resíduos de tirosina e treonina pela MEK, também designada MAPKK (proteína quinase ativadora da MAPK). A MEK também é ativada pela fosforilação mediada, no entanto, pelas proteínas MOS no oócito e RAS/RAF nas células do *cumulus* (UCAR et al., 2013).

A MAPK quando ativa promove a estabilização do fator promotor da maturação (MPF) nos oócitos, pela inibição de alguns reguladores negativos deste fator e da ativação da enzima cdc25 fosfatase. Em oócitos bovinos, a ativação da MAPK e do MPF ocorre praticamente ao mesmo tempo, pouco antes da QVG, sendo que a atividade da MAPK aumenta gradualmente ao longo da maturação oocitária e mantém-se alta até o estágio de MII. Níveis elevados de MAPK e MPF são necessários para a manutenção dos oócitos no estágio de MII, sendo que a fertilização ou ativação partenogenética promove a queda abrupta na concentração intraoocitária dessas duas quinases e conduz à conclusão da meiose (UCAR et al., 2013).

A ativação e inativação da MAPK também está relacionada à variação na concentração de cAMP e PKA, tanto no oócito quanto nas células do *cumulus*. Segundo

Sun et al. (2002) a ativação da MAPK nas células do *cumulus* também depende dos fatores parácrinos secretados pelo oócito, o que demonstra a capacidade do oócito em controlar sua própria maturação meiótica e a retomada da maturação nuclear *in vitro* ocorre espontaneamente e independentemente da ativação desta proteína.

Fator Promotor de Maturação (MPF)

O MPF é uma quinase envolvida na divisão celular e na regulação do ciclo de transição da célula G2/M de todas as células eucarióticas. É um dos principais reguladores das alterações que ocorrem durante a maturação oocitária, regulando a condensação dos cromossomos, o rompimento do envelope nuclear, a reorganização dos microtúbulos e outras organelas citoplasmáticas (LEFEBVRE et al., 2002).

A ativação do MPF é também um ponto chave da retomada da meiose em oócitos, que corresponde à transição da G2/M. A ativação ocorre em duas etapas e envolve a formação de um complexo entre a subunidade da quinase (p34^{cdc2} ou CDK1) e uma subunidade regulatória (ciclina B). Uma vez formado, esse complexo pode ser ativado pela desfosforilação da treonina 14 e de resíduos da tirosina 15 da subunidade p34. Assim, em bovinos, a atividade do MPF requer tanto a neossíntese protéica como as cascatas de fosforilação/desfosforilação. A estabilidade da atividade do MPF pode ser prevenida por drogas que agem nesses dois níveis (MERMILLOD et al., 2000).

A variação da atividade do MPF pode ser detectada nos oócitos bovinos durante a maturação. Sua atividade é baixa no estágio de GV, passando a ser observada no início da QVG. Alcança um pico em MI, declina sua atividade durante a transição entre os estádios de MI e MII e eleva-se novamente para a entrada do oócito em MII. Sua inativação nos oócitos em estágio de MII é induzida pela fecundação ou pela ativação paternogenética (KUBELKA et al., 2000).

O processo de desorganização do heterodímero do complexo MPF independe da sua ativação catalítica, que é causada geralmente pela proteólise da ciclina B. Em oócitos fecundados de camundongos e de suínos, a degradação da ciclina B foi claramente relacionada com a inativação do complexo MPF (GOTTARDI e MINGOTI, 2009).

2. Fármacos inibidores da meiose

O bloqueio da meiose antes da maturação tem sido sugerido como meio para permitir aos oócitos um tempo adicional no cultivo sem sofrer modificações, como a pré-maturação (LONERGAN et al., 2000). O bloqueio meiótico foi induzido por várias estratégias, incluindo o aumento no cAMP no oócito (SIRARD et al., 1998), pela síntese de proteínas ou pela inibição da fosforilação (SIRARD e COENEN, 1994; LONERGAN et al., 1997; AVERY et al., 1998).

Assim, várias abordagens farmacológicas têm sido utilizadas para manter o bloqueio meiótico em oócitos bovinos. Os inibidores das quinases dependentes de ciclinas (CDK), tais como a butirolactona I (BL-I) (KUBELKA et al., 2000; HASHIMOTO et al., 2002; ADONA e LEAL, 2004; ADONA et al., 2008; FERREIRA et al., 2009a) e a roscovitina (ROS) (MEIJER et al., 1997; MERMILLOD et al., 2000; PONDERATO et al., 2001; LAGUTINA et al., 2002; LONERGAN et al., 2003; JIMENEZ-MACEDO, et al., 2006) têm sido utilizados com sucesso em induzir o bloqueio meiótico.

Estes inibidores de CDK agem seletivamente na atividade do fator promotor de maturação (MPF), que está envolvida em vários eventos durante a maturação (KUBELKA et al., 2002), como o desenvolvimento *in vitro* (HASHIMOTO et al., 2002) e *in vivo* (PONDERATO et al., 2002; COY et al., 2005a) de oócitos submetidos ao bloqueio meiótico antes da maturação.

Na produção *in vitro*, os oócitos são aspirados de folículos entre 2 e 8 mm de diâmetro. Nestas condições, eles são removidos dos folículos antes de completarem a foliculogênese, o que provavelmente seria um dos fatores envolvidos na baixa produção de embriões. Além disso, os oócitos não passam pelo período de capacitação que ocorre *in vivo*, em que modificações ocorrem enquanto o oócito é mantido em VG e o folículo cresce até ocorrer a ovulação.

2.1 Butirolactona I (BL-I)

A butirolactona I (BL-I) é uma purina derivada de micélios de *Aspergillus SP* e inibe especificamente as quinases dependentes de ciclinas (CDK2 e cdc2). Tem se mostrado um eficiente inibidor seletivo e reversível do reinício da meiose em oócitos bovinos por 24 horas, sem efeito negativo sobre desenvolvimento até o estágio de

blastocisto (MOTLIK et al., 1998; IMAI et al., 1999; KUBELKA et al., 2000; LONERGAN et al., 2000; FERREIRA et al., 2009a; QUETGLAS et al., 2011).

A BL-I age sobre quinase dependente de ciclina e tem alguns efeitos inibitórios sobre proteínas quinase, tais como a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (MOTLIK et al., 1998; PONDERATO et al., 2001). Assim, autores demonstraram que BL-I na concentração de 100 μ M pode bloquear a maturação meiótica de oócitos bovinos por 24 ± 48 horas (KUBELKA et al., 2000; ADONA et al., 2008; FERREIRA et al., 2009).

Ferreira et al. (2009b) com o objetivo de avaliar os efeitos da BL-I na pré-maturação e na maturação, sobre os efeitos na progressão da meiose e na morfologia do fuso meiótico e na distribuição cromossômica em oócitos bovinos, observaram que esta droga permitiu o bloqueio da meiose por 24 horas em 90 % dos oócitos. A alta eficiência de BL-I também foi previamente demonstrada na espécie bovina e outras espécies (KUBELKA et al., 2000; HASHIMOTO et al., 2002; ADONA e LEAL, 2004; GRUPEN et al., 2006).

Da mesma forma, Ferreira et al. (2009) observaram que a inibição da meiose mostrou-se completamente reversível. A reversão da inibição após a MIV foi semelhante ao obtido por outros autores (KUBELKA et al., 2000; HASHIMOTO et al., 2002; ADONA e LEAL, 2004) em oócitos cultivados por 24 horas após inibição. No entanto, os oócitos cultivados por 18 horas em meio de MIV depois de inibição, apresentaram resultados inferiores (73,6 % atingiram MII) quando comparados aos dados obtidos por Adona e Leal (2004) (94 %). Isto pode ser devido, segundo estes autores, a possíveis condições ambientais desfavoráveis, como o estresse térmico e nutricional dos animais.

Entre os vários tipos de inibidores existentes, a BL-I provou ser altamente eficaz no bloqueio da QVG de oócitos bovinos (LONERGAN et al., 2000; PAVLOK et al., 2000), com redução de alterações ultraestruturais em relação aos seus análogos sintéticos, como a roscovitina, e com resultados satisfatórios sobre a embriogênese (ADONA e LEAL, 2004).

Embora a aparência ultraestrutural de oócitos bovinos antes e depois da maturação tenha sido amplamente relatada, pouco se sabe sobre as alterações ultraestruturais causadas nos oócitos bovinos após inibição da meiose artificial *in vitro* (ADONA et al., 2008).

Autores descreveram mudanças no núcleo do oócito bovino após 8 horas de inibição da meiose com produtos químicos e biológicos (FAERGE et al., 2001), assim como alterações nucleares em oócitos bovinos expostos a BL-I por 40 horas durante a fase de crescimento (FAIR et al., 2001). Entretanto, outros autores não observaram alterações morfológicas em oócitos bovinos imaturos e maturados *in vitro* em concentrações conhecidas de BL-I por 24 horas (LONERGAN et al., 2000; MERMILLOD et al., 2000; LONERGAN et al., 2003; FERREIRA et al., 2009b).

Estudos relatam que a utilização de BL-I (100 μ M) ao meio de maturação acarretou uma menor taxa de clivagem, quando comparado ao grupo controle livre do fármaco. Entretanto, estes autores demonstram que a BL-I é adequada para manter os oócitos em parada meiótica por 24 horas sem comprometer o potencial de desenvolvimento em blastocistos ou sobrevivência ao processo de criopreservação (LONERGAN et al., 2000).

2.2 Roscovitina (ROS)

A roscovitina (ROS) é um análogo sintético de purina específica, a qual inibe a atividade do fator promotor da maturação (MPF) mantendo os oócitos bovinos no estágio de vesícula germinativa. Mermillod et al. (2000) investigaram o uso de 25 μ M ROS durante 24 horas ao meio de MIV e observaram a manutenção da viabilidade dos oócitos bovinos sem comprometimento do desenvolvimento embrionário.

Sandri (2007) ao associar a ROS, cordicepim (bloqueador da tradução do mRNA) e o IGF-I (fator de crescimento) observou que a produção de blastocisto foi semelhante ao grupo controle, entretanto quando a roscovitina (25 μ M) foi utilizada de forma isolada, observou-se efeito negativo sobre o oócito.

O uso isolado deste produto foi testado em outros estudos e os resultados foram controversos (ADONA e LEAL 2004; MERMILLOD et al. 2000). Segundo Sandri (2007) este efeito negativo, provavelmente se deve aos danos no citoesqueleto e na reorganização na cromatina na retomada meiótica.

Estudos demonstram que a ROS inibe o fator de crescimento epidermal (EGF), evitando a expansão das células do *cumulus*. Este fato é plausível, uma vez que este fármaco comprovadamente inibe MAPK, assim as gonadotrofinas responsáveis pela expansão deste tipo celular (COY et al., 2005).

Em oócitos de gato, a ROS nas concentrações de 12,5 e 25 μM demonstraram menor eficiência quando comparada com outras doses (50, 100 e 200 μM). Doses mais elevadas de ROS induziram a apoptose celular nas células do *cumulus*, como também em elevado número de oócitos degenerados após maturação *in vitro*. O pré-tratamento com ROS a 12,5 e 25 μM antes da maturação *in vitro* reduziu a capacidade de desenvolvimento dos oócitos quando comparada ao grupo controle não tratado. Entretanto, a ROS mostrou-se reversível em oócitos de gato, mantendo-os no estágio de VG, sem efeitos negativos sobre a maturação nuclear. Outros autores relatam, porém que este fármaco agiu de modo negativo na viabilidade das células do *cumulus* e na competência de desenvolvimento embrionário (SANANMUANG et al., 2010).

2.3 Associação de Butirolactona I (BL-I) e Roscovitina (ROS)

Estudos indicaram que a associação de BL-I e ROS têm a mesma via inibitória, os dois fármacos competem com as moléculas de ATP em seus sítios de ligação bloqueando a fosforilação proteína quinase p34^{cdc2}. Esta inibição é reversível e tem como objetivo de aumentar a capacidade de desenvolvimento dos oócitos (PONDERATO et al., 2001).

Estes mesmos autores utilizaram concentrações de 6,25 μM a 100 μM de BL-I e de 6,25 μM a 25 μM de ROS associados e verificaram que até 12,5 μM de cada um dos fármacos, 100% dos oócitos mantiveram-se em estágio de VG (PONDERATO et al., 2001). Da mesma forma, Adona et al. (2008) associaram 100 μM de BL-I ou 6,5 μM de BL-I juntamente com 12,5 μM de ROS por 24 horas e verificaram que 89 % dos oócitos mantiveram-se em estágio de VG.

Após a liberação do bloqueio da meiose de oócitos, colocando-os em meio de maturação *in vitro*, Adona et al. (2008) verificaram a aceleração no reinício da meiose em 80-85% dos oócitos tratados com BL-I ou com BL-I + ROS depois de 3 horas de cultivo. Ponderato et al. (2001) também observaram aceleração de oócitos tratados com BL-I + ROS em 70% dos oócitos após 2 horas de MIV. Hashimoto et al. (2002), utilizando BL-I sozinho, encontrou 40% dos oócitos em VGapós 2 horas de maturação.

Hashimoto et al. (2002) relataram que a inibição meiótica com BL-I, em baixa tensão de oxigênio (5%) melhorou a capacidade de desenvolvimento do oócito em comparação com o grupo não tratado. Da mesma forma, a ROS mostrou-se eficaz tanto em oócitos bovinos (MERMILLOD et al., 2000) como de suínos (KRISCHEK e

MEINECKE, 2001; MARCHAL et al., 2001). Além disso, estudos relatam que a combinação de ambas as substâncias (BL-I + ROS), em concentrações reduzidas, diminuiu os efeitos negativos sobre o desenvolvimento posterior até o estágio de blastocisto (PONDERATO et al., 2001) ou no desenvolvimento normal do feto durante os primeiros estágios da organogênese (PONDERATO et al., 2002).

2.4 Alterações ultraestruturais com a utilização de fármacos inibidores da meiose oocitária

Estas drogas utilizadas para o bloqueio meiótico dos oócitos podem causar danos ultraestruturais aos oócitos (FAERGE et al., 2001; LONERGAN et al., 2003), porém doses reduzidas destes fármacos podem evitar estas alterações.

Assim, a análise do impacto de tais tratamentos sobre as estruturas celulares é de fundamental importância, como as proteínas do citoesqueleto (BRUNET e MARO, 2005; SOL e SCHATTEN, 2006) e a distribuição de organelas (STOJKOVIC et al., 2001; BREVINI et al. 2007).

Kim et al. (2000) demonstraram estreita relação entre a maturação nuclear e a dinâmica do citoesqueleto em oócitos suínos e bovinos. A dinâmica do citoesqueleto também está relacionada com desenvolvimento de oócitos e com sua competência (BREVINI et al., 2007). O correto posicionamento das organelas também é importante, visto que oócitos bovinos de qualidade inferior apresentam falha no deslocamento das mitocôndrias da periferia do citoplasma para o centro (STOJKOVIC et al., 2001).

A organização do citoesqueleto e migração de organelas, como grânulos corticais e mitocôndrias tem sido relacionados à competência do oócito (HYTTEL et al., 1997). Adona et al. (2008) observaram coloração positiva dos microtúbulos em oócitos durante a MIV, tratados com diferentes concentrações de BL-I independentemente do tratamento. Estes autores não observaram alterações no fuso meiótico nos oócitos tratados. Assim, estes resultados obtidos por Adona et al. (2008) são semelhantes aos reportados por Kim et al. (2000) para oócitos bovinos maturados *in vitro* com BL-I, sugerindo que não ocorre alteração na dinâmica de microtúbulos durante a MIV, como observado com oócitos suínos (WU et al., 2002).

Ju et al. (2003), no entanto, observaram alterações no citoesqueleto de oócitos suínos, porém somente em concentrações maiores de BL-I, como fez Albrarrac'in et al.

(2005) em oócitos de novilhas. No entanto, as maiores alterações são observadas nas cromatinas, quando são utilizadas elevadas concentrações de BL-I (JU et al., 2003).

Observações nos microtúbulos e microfilamentos sugerem que o bloqueio meiótico em condições adequadas não afeta a organização dessas estruturas. Isso é importante, pois com a utilização destes fármacos, há uma interação entre citoesqueleto, a cromatina e os movimentos de organelas, importantes para a maturação de oócitos (KIM et al., 2000; BRUNET e MARO, 2005). Além disso, o citoesqueleto está envolvido na localização de determinadas proteínas, incluindo aquelas que controlam o ciclo celular (NAKAMURA et al., 2005).

Brevini et al. (2007) demonstraram que as condições de cultivo sub ótimo podem influenciar a organização dos microtúbulos e, conseqüentemente, alterar a localização de proteínas específicas e mensageiras dentro do oócito, influenciando na competência oocitária.

Os grânulos corticais (GC) em oócitos imaturos são distribuídos por todo o citoplasma e conforme a maturação progride estes grânulos migram para o córtex (VELILLA et al., 2004). Não foi observada a migração dos GC em oócitos bloqueados por 24 horas com BL-I, em diferentes concentrações, assim manteve-se a distribuição observada em oócitos imaturos do grupo controle (ADONA et al., 2008).

No entanto, Barretto et al. (2007) observaram migração parcial em oócitos maturados *in vitro* por 24 horas com ROS. Quase 40% dos oócitos exibiram um “citoplasma maduro”, porém a maturação nuclear foi parcialmente bloqueada (67 % dos oócitos em MI e 24 % em MII), sugerindo que a migração ocorreu devido ao ineficiente bloqueio meiótico.

A BL-I, pela ação do MPF é capaz de inibir a migração dos grânulos corticais. Wessel et al. (2002) sugeriram que a ROS, pela sua ação no bloqueio da meiose em ouriço-do-mar, inibiu a migração dos GCs. Após bloqueio meiótico com BL-I, a migração dos GCs foi semelhante à observada em oócitos controle, sugerindo que o bloqueio da migração de GCs também é reversível. Coy et al. (2005a) observaram também a migração normal dos GCs após a MIV de oócitos já bloqueados com ROS.

Do mesmo modo, as mitocôndrias têm um papel fundamental na geração de ATP para a maturação, fertilização e desenvolvimento dos embriões (WILDING et al., 2001). Durante o estágio de VG, estas organelas estão, na sua maioria, concentradas na periferia do oócito, enquanto em oócitos maduros (MII), estas estruturas migram em direção ao centro (STOJKOVIC et al., 2001).

Adona et al. (2008) verificaram diferença na distribuição das mitocôndrias em oócitos imaturos e do grupo controle (100 % com mitocôndrias na periferia) e oócitos tratados (82-87 % de oócitos com esta distribuição). Entre 13-18 % dos oócitos tratados tiveram migração mitocôndrias semelhantes aos oócitos maturados, apesar dos oócitos permanecerem no estágio de VG com BL-I. Estes dados demonstram que a migração mitocôndrias não é completamente bloqueada pela inibição do MPF e/ou pela MAPK, a qual é indiretamente inibida por este fármaco (KUBELKA et al., 2000).

Wu et al. (2002) também observaram a migração de mitocôndrias em oócitos suínos bloqueados com BL-I. Vigneron et al. (2004) relataram que durante bloqueio da meiose, os mesmos acumulam algumas proteínas envolvidas no controle do ciclo celular sugerindo que a maturação citoplasmática não está completamente bloqueada e que outros fatores, além MPF podem participar deste controle.

A falta de atividade MPF também pode causar efeitos sobre as proteínas motoras, responsáveis pela circulação das organelas citoplasmáticas. Quando a proteína motora dineína é fosforilada pelo MPF, o movimento organela é inibido (ADDINALL et al., 2001). No entanto, pouco se sabe sobre a atividade das proteínas motoras e sua relação com as proteínas do ciclo celular durante a maturação de oócitos de mamíferos. Ademais, o MPF e/ou MAPK também podem interferir no controle do movimento das organelas, pois 80 % dos oócitos ainda apresentam migração de mitocôndrias, em oócitos bloqueados pela BL-I (ADONA et al., 2008).

Apesar de diversos trabalhos considerarem que a competência final do oócito seja o ponto final dos estudos, outros experimentos mostram que a correlação entre a quantidade e a distribuição das organelas é de difícil justificativa para a função do citoesqueleto, assim como para a ocorrência de eventos moleculares e aquisição de competência do oócito.

Novos estudos, com adequada metodologia são necessários para compreender melhor esta associação. Como por exemplo, as controvérsias sobre a função das organelas citoplasmáticas durante o processo de maturação citoplasmática. Há uma falta de coerência nas informações durante a maturação de oócitos bovinos sobre o envolvimento do ribossomo, retículo endoplasmático e do complexo de Golgi. Existem algumas evidências que indicam um papel importante das mitocôndrias na aquisição de competência oocitária para o desenvolvimento. No entanto, no que se diz respeito ao conteúdo de ATP do oócito, vários relatos não encontraram uma correlação entre a capacidade de desenvolvimento e o conteúdo ATP. Além disso, é interessante uma

abordagem sobre a compreensão dos mecanismos intra e extracelulares envolvidos na aquisição de competência (ADONA et al., 2008).

3. Apoptose celular

A necrose e a apoptose são dois processos distintos de morte celular, sendo a necrose o resultado de uma injúria que afeta um grande grupo de células, causando edema celular e ruptura de membrana que provoca uma resposta inflamatória em tecidos saudáveis adjacentes. Em contrapartida, a apoptose afeta células isoladas, não compromete tecidos próximos e não possui uma resposta inflamatória associada. Trata-se de uma forma fisiológica normal de morte celular, que ao contrário da necrose, caracterizada por um processo ativo de alterações morfológicas e fisiológicas, a fim de manter a homeostase do tecido (HENDRICKS e HANSEN, 2009).

A apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas. De um modo geral, a apoptose é um fenômeno bastante rápido: ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta.

A seguir, a membrana celular forma prolongamentos e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas contendo o conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório. Outra característica muito marcante da morte por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA, a qual possui um padrão característico (GRIVICICH et al., 2007)

No decorrer do desenvolvimento embrionário, a quantidade de corpúsculos apoptóticos aumenta. Esta elevação é indicativa de que os embriões são capazes de remover as células com um potencial inapropriado regulando a diferenciação celular (DE LA FUENTE e KING, 1997).

As características morfológicas da morte celular por apoptose, como a condensação da cromatina, marginalização e fragmentação nuclear, são visíveis nos estágios de mórula e blastocisto produzidos tanto *in vitro* como *in vivo*. A apoptose espontânea é primeiramente

observada nos embriões bovinos no estágio de 8-16 células no período coincidente com a ativação do genoma embrionário. Muitos sinais diferentes podem induzir a apoptose e a exposição dos embriões a ambientes adversos pode, por exemplo, aumentar o número de células apoptóticas em resposta ao estresse ocasionado, como em caso de estresse térmico e de condições desfavoráveis do meio de cultivo embrionário (HARDY, 1999).

Do ponto de vista bioquímico a apoptose caracteriza-se por alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial externa que se torna permeável a proteínas (PATTERSON et al., 2000), redução no potencial de membrana mitocondrial (PMM) regulado por proteínas da família Bcl-2 (HIRSCH et al., 1997; DESHMUKH et al., 2000; GOLDSTEIN et al., 2000), desorganização da camada bilipídica com translocação da fosfatidilserina da camada interna para camada externa da membrana plasmática (MARTIN et al., 1995).

No núcleo, a mudança bioquímica mais bem definida é a ativação da cascata das enzimas caspases que desencadeia a ativação da DNase (*caspase activated DNase*) (Desoxirribonuclease). A ativação da DNase leva a clivagem do DNA entre nucleossomos, gerando fragmentos de DNA entre 180-200 pb (WYLLIE et al., 1997; SARASTE e PULKKI, 2000).

Esses estudos identificaram genes importantes envolvidos na apoptose (ced-3, ced-4 and ced-9) (HORVITZ et al., 1982; ELLIS e HORVITZ, 1986) e levaram a descoberta de seus homólogos em mamíferos. Em mamíferos, o gene supressor da apoptose, Bcl2, sempre está associado ao gene proteína humana fator de ativação de proteases associada à apoptose (APAF-1), o que impede a ativação da caspase 9. Quando a apoptose é iniciada, a proteína humana Bax se associa a Bcl2, liberando a APAF-1 e ativando a caspase 9 que leva a apoptose (HENGARTNER, 2000).

As caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) pertencem à família das cisteínas proteases que clivam especificamente seus substratos em resíduos de ácido aspártico. As caspases sinalizam para a apoptose e clivam os substratos levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos. As caspases são sintetizadas como precursores inativos denominados zimogênios. Após um sinal de morte celular, as caspases são ativadas por clivagem proteolítica. Essas enzimas podem interagir com receptores de membrana ou moléculas adaptadoras que contenham domínios de morte (BOATRIGT e SALVESEN, 2003).

Algumas destas proteínas são anti-apoptóticas (bcl-2 e bcl-XL) enquanto outras são pró-apoptóticas (Bad, Bax e Bid). A sensibilidade das células ao estímulo indutor da apoptose depende do balanço entre estas proteínas. Quando existe um excesso de proteínas pró-apoptóticas a célula fica mais sensível a apoptose e quando existe um excesso de proteínas anti-apoptóticas a célula fica mais resistente.

As proteínas pró-apoptóticas são frequentemente encontradas no citosol, onde atuam como sensores do dano ou estresse celular. Após o estímulo estressante, estas proteínas são realocadas na superfície da mitocôndria, onde existem proteínas anti-apoptóticas. Esta interação entre as proteínas pró e anti-apoptóticas desfaz a função normal das proteínas anti-apoptóticas e leva a formação de poros (PT - Permeability Transition pore) na membrana mitocondrial, por onde sai o citocromo c e outras moléculas pró-apoptóticas.

Este processo leva, então, a ativação da cascata de caspases. Quando o citocromo c é liberado no citosol ele interage com uma proteína chamada Apaf-1, levando ao recrutamento da pró-caspase-9 para dentro de um complexo multiproteína formado pelo citocromo c e pela Apaf-1. Este complexo é chamado apoptossomo e promove a ativação da caspase 9 induzindo também a ativação da caspase 3. As caspases são proteases promotoras da apoptose, que induzem mudanças no transporte de elétrons, perda do potencial de membrana mitocondrial e alteração no estado de redução-oxidação celular. Além disso, a caspase 3 lisa o citoesqueleto celular levando à desestruturação celular, característica da apoptose (PARONE, 2002).

4. Vitriificação de embriões produzidos *in vitro*

A criopreservação permite a estocagem de material biológico por tempo indeterminado, facilitando o transporte, com diminuição dos riscos de transmissão de doenças e a comercialização de material genético, sendo amplamente usada pelas indústrias de transferência de embrião.

No entanto, como diversas pesquisas têm demonstrado que a viabilidade após a criopreservação é menor em embriões PIV quando comparada com embriões produzidos *in vivo*, estudos ainda são necessários para otimizar os índices de sobrevivência de embriões após a criopreservação.

Desta maneira, se faz necessário o aperfeiçoamento não somente da técnica de PIV, mas também das técnicas de criopreservação. Neste sentido, a vitrificação vem sendo utilizada para tentar obter melhores taxas de sobrevivência embrionária (SOMMERFELD & NIEMANN, 1999).

A velocidade de criopreservação durante a vitrificação é alta, em que ocorre a imersão direta da solução contendo o embrião no N₂ líquido, a partir da temperatura ambiente. O processo de vitrificação mostra-se mais vantajoso em comparação à técnica de congelação. Neste processo observa-se uma redução das crioinjúrias, pela ausência de formação de cristais intracelulares, uma redução de custos visto que não é necessário o aparelho de congelação e maior rapidez no processo (OKADA et al, 2002).

Na vitrificação, a formação de cristais de gelo é prevenida pelas altas concentrações de crioprotetores, assim como pela rápida refrigeração e aquecimento. As altas concentrações de crioprotetores em que os embriões são expostos levam ao aumento da viscosidade dos meios intra e extracelulares, possibilitando uma refrigeração rápida e induzindo a mudança do estado líquido para o vitrificado, sem a formação de cristais de gelo (VAJTA e KUWAYAMA, 2006).

As taxas de sobrevivência dos embriões PIV, bem como sua qualidade após criopreservação, não são afetadas somente pela grande quantidade de lipídios, mas também pela qualidade e idade do embrião, estágio de desenvolvimento embrionário, crioprotetor, pH do meio de criopreservação, método de criopreservação e sistema de cultivo no qual os embriões são produzidos (HASLER et al., 2003). No entanto, até o presente momento, a principal causa na diminuição da qualidade em embriões PIV após a criopreservação ainda permanece a hipótese da suplementação do meio de cultivo com soro fetal bovino (SFB) (BARCELO-FIMBRES e SEIDEL, 2007; SARAGUSTY e ARAV, 2010).

A vitrificação é um dos métodos de criopreservação que elimina as metodologias laboriosas dos métodos convencionais (RALL, 1987). Entretanto, apresenta como desvantagem o seu efeito tóxico, pela elevada concentração de crioprotetores na solução (PUGH et al., 2000). Pode-se minimizar o efeito tóxico dos crioprotetores adicionando macromoléculas e açúcares na solução, ou combinando crioprotetores, como o etilenoglicol (EG) (MARTINO et al., 1996).

Estas substâncias crioprotetoras acarretam danos osmóticos e tóxicos, assim uma das estratégias para evitar a toxicidade consiste na diminuição do tempo de exposição dos embriões à solução. Porém, se essa exposição for muito curta, a

penetração do crioprotetor não é suficiente e o gelo intracelular é formado mesmo quando o gelo extracelular estiver ausente. Portanto, um tempo de exposição ótimo para o sucesso da vitrificação deve ser um meio termo entre a prevenção das injúrias tóxicas e prevenção da formação de gelo intracelular (VAJTA e KUWAYAMA, 2006).

Algumas estratégias sobre vitrificação e aquecimento são implantadas para melhorar a sobrevivência, tal como transferir o embrião em pequenos volumes de meio para facilitar o contato com o N₂ líquido e alcançar um estado vítreo. Além do mais, reduzindo as concentrações dos crioprotetores, haverá menos probabilidade de toxicidade embrionária (RIOS et al., 2010). Diminuindo o volume do crioprotetor, minimiza a probabilidade de aparecimento de fragmentos vítreo do meio, os quais normalmente aparecem quando o volume é superior a 1 µL (WASS et al., 2002).

O pequeno volume de meio foi sugerido, por ocorrer íntimo contato com o N₂ líquido obtendo-se uma rápida taxa de resfriamento para alcançar o estado vítreo. Assim se permite usar menos concentrações dos crioprotetores com conseqüente redução da toxicidade do embrião (RIOS et al., 2010).

A vitrificação utilizando palhetas de 0,25 mL vem oferecendo vantagens para a biotecnologia de embriões quando aplicada a campo, justamente pelo aumento da sobrevivência do embrião e pela redução do custo da transferência embrionária (GUIGNOT et al., 2006). O uso dessa técnica utilizando-se o etileno glicol (EG) ou 1,2 propileno glicol, tem levado a obtenção de resultados animadores, pois esses crioprotetores penetram na célula rapidamente, com menor ocorrência de choque osmótico (PALASZ e MAPLETOFT, 1996).

Autores observaram que os embriões após vitrificação em palhetas francesas mantiveram sua morfologia semelhante àqueles não vitrificados, apresentando poucas lesões em seu citoplasma e na membrana celular (OKADA et al., 2002). Campos-Chillòn et al. (2006), também relataram que a vitrificação de embriões utilizando-se de palhetas francesas consiste num ótimo protocolo com pouca influência sobre a viabilidade embrionária.

Além destas vantagens já citadas, a vitrificação em palhetas de 0,25 mL diminui o risco de contaminação durante o processo, mantendo uma elevada taxa de resfriamento em N₂ líquido (- 210 °C). Este método protege a amostra biológica do contato direto com o N₂ durante o processo de vitrificação e posterior armazenamento (YAVIN et al., 2009).

Resultados animadores na vitrificação de embriões com a utilização desta técnica têm sido relatados por alguns autores. DATTENA et al. (2000) obtiveram de 62 embriões colhidos e vitrificados, 52 (83,8 %) com reexpansão da blastocela após cultivo por 24 horas e 39 cordeiros nascidos (62,9 %). BARIL et al. (2001), relataram taxa de prenhez e de sobrevivência embrionária depois da inovulação de embriões vitrificados de 72 e 50 %, respectivamente.

A partir disso, a otimização dos fatores que envolvem todos os processos de PIV é o que refletirá em uma melhor ou pior qualidade embrionária. Portanto, torna-se indispensável, uma melhora das condições de maturação para que ocorra uma adequada competência oócitaria e, principalmente, uma evolução nos processos de vitrificação, uma vez que o uso de embriões após uma adequada estocagem acarretará em nascimentos de bezerros saudáveis.

Capítulo 2

Trabalho enviado para a Revista *Reproduction in Domestic Animals*

“Produção *in vitro* de embriões bovinos utilizando-se oócitos maturados por diferentes tempos na presença de roscovitina, butirolactona-I e suas associações.”

RRD Maziero^{1*}, CRF Guaitolini¹, DM Paschoal¹, MD Guastali¹, CN Moraes¹, MJ Sudano¹, PN Guasti¹, PM Papa¹, AM Crespilho², Bianca Andriolo Monteiro¹, FO Papa¹,
FC Landim-Alvarenga¹

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil.

² Universidade Santo Amaro.

*Autor para correspondência:

Rosiára Rosária Dias Maziero

Endereço: Rubião Jr. s/n, CEP: 18618-970, Botucatu/SP, Brasil

Universidade Estadual Paulista, UNESP/FMVZ, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

Fone/Fax: +55 14 3880 2119

e-mail: rosiaramaziero@yahoo.com.br

Resumo

Uma das alternativas para se melhorar a qualidade do oócito e conseqüentemente do embrião é a utilização de fármacos que induzem a inibição da maturação meiótica, promovendo, ao mesmo tempo uma melhor maturação citoplasmática. Deste modo, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição dos inibidores da meiose oocitária roscovitina (ROS; Sigma-Aldrich, St. Louis) e butirolactona I (BL-I, Enzo Life Sciences International, Inc. 5120 Butler Pike Plymouth Meeting, PA 19462) na produção *in vitro* de embriões bovino. Oócitos oriundos de ovários de abatedouro foram maturados em TCM-199 com sal Earle's +10 % de SFB, FSH e LH, em atmosfera de 5 % de CO₂. Para atrasar a meiose, os oócitos foram mantidos inicialmente por 24 horas em ROS (25 µM) e em BL-I 100 µM, sendo o índice de maturação nuclear avaliado. Em um outro experimento, os oócitos foram mantidos durante 6 e 12 horas em meio MIV na presença de ROS nas concentrações de 25 µM e 12,5 µM; de BL-I nas concentrações de 100 µM e 50 µM e da associação dos fármacos na concentração de 6,25 µM de ROS e 25 µM de BL-I. Em seguida, os oócitos foram cultivados respectivamente durante 18 e 12 horas em meio livre do agente para a retomada da meiose. Depois de 24 horas de maturação (dia 0), os oócitos foram fertilizados em meio Human Tubal Fluid (HTF – Irvine, Santa Ana, Califórnia) sob as mesmas condições acima. O sêmen foi selecionado por gradiente Percoll e a concentração foi ajustada para 2×10^6 espermatozoides/mL. Os prováveis zigotos foram cultivados em gotas de 90 µL de meio SOFaa + 0,6 % BSA + 2,5 % SFB numa atmosfera de 5 % de CO₂, 5 % de O₂, 90 % de N₂ até o dia 7, quando foi avaliada a taxa de formação de blastocisto. Foram realizadas 25 rotinas (200 oócitos/rotina). Os dados foram analisados com ANOVA, seguido pelo teste de Tukey utilizando o modelo linear geral (PROC GLM) do SAS 9.2. O nível de significância adotado foi de 5%. A utilização dos fármacos por 24 horas

resultou em grande número de oócitos degenerados ao final do período de MIV. Este efeito diminuiu com a redução do tempo de bloqueio meiótico. Não foram observadas diferenças estatísticas na taxa de produção de blastocisto em oócitos inibidos por 6 horas em relação ao grupo controle ($P > 0,05$). Entretanto, com a inibição dos oócitos por 12 horas verificamos queda na produção de embriões em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). O número total de células íntegras dos embriões e a taxa de apoptose foi semelhante entre os grupos ($P > 0,05$). O bloqueio da meiose, da forma utilizada no presente experimento, se mostrou totalmente reversível e quando utilizada por 6 horas não interferiu nos índices de produção embrionária, nem tão pouco na qualidade do embrião produzido.

Palavras-chave: Bovinos, Oócitos, Maturação nuclear, inibidores meióticos, produção embrionária *in vitro*.

Introdução

A produção de embriões *in vitro* (PIV) pela maturação, fecundação e cultivo *in vitro* tornou-se uma valiosa tecnologia de reprodução assistida em sistemas de criação bovina. Entretanto, mesmo com as notáveis inovações neste sistema, os maiores entraves para o pleno sucesso desta biotecnologia são os baixos índices de prenhez pós-transferência e a maior sensibilidade dos embriões à criopreservação (Long, 2008).

Assim, muitos laboratórios tentam melhorar o potencial de desenvolvimento e a qualidade do oócito durante a maturação *in vitro* (MIV). A eficiência da tecnologia de MIV refere-se ao estado bioquímico e molecular do oócito maturo capaz de ser fertilizado naturalmente e desenvolver um embrião, que ao transferido, permita seu desenvolvimento a termo (Gilchrist e Thompson, 2007).

In vivo, o pico de LH desencadeia a ruptura das junções gap entre o oócito e as células da granulosa no folículo pré-ovulatório (Eppig, 1991). O isolamento dos oócitos imaturos antes que ocorra a MIV pode interromper a transferência de nutrientes e suporte metabólico essencial para a conclusão da maturação, resultando na ativação precoce de maturação nuclear e posterior comprometimento de desenvolvimento do ooplasma (Carabatsos al., 2000).

In vitro, a retomada da meiose ocorre quando há liberação do fator de inibição a partir do folículo (Kotsuji et al., 1994). No entanto, o resultado da maturação *in vitro* na produção de embriões é reduzido, sugerindo que nem todos os oócitos têm a capacidade de amadurecer devidamente, pois alguns oócitos são capacitados, sem retomar a meiose (Hyttel et al., 1997).

Sendo assim, uma das técnicas estudadas para melhorar a MIV consiste na inibição da maturação meiótica (nuclear) promovendo, ao mesmo tempo, o desenvolvimento do ooplasma. A maturação espontânea do oócito pode ser evitada pelo

uso de inibidores da quinase dependente de ciclina específicos (CDK), como a butirolactona I (BL-I) e a roscovitina (ROS), as quais inibem a atividade do fator promotor da maturação (MPF) do oócito (Gilchrist, 2011).

Embora tal procedimento resulte na maior parte das vezes em desenvolvimento similar a embriões oriundos de oócitos não tratados, esta metodologia tem sido utilizada como importante ferramenta para a pesquisa do desenvolvimento e da diferenciação do oócito (Sirard, 2001).

O MPF e a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) são os principais fatores reguladores da maturação e suas atividades são direta (MPF) e indiretamente (MAPK) afetadas por inibidores de quinases dependentes de ciclina (CDK) (Kubelka et al., 2000). O controle do ciclo celular meiótico depende das proteínas que constituem o MPF, a p34^{cdc2} e a ciclina B1, e também da MAPK, representada pelas proteínas p44 e p42 (ERK1 e ERK2) (Quetglas et al., 2011).

A butirolactona I (BL-I) é uma purina derivada de micélios de *Aspergillus SP* e inibe especificamente as quinases dependentes de ciclinas (CDK2 e cdc2). Já a roscovitina (ROS) é um análogo sintético de purina específica, a qual inibe a atividade do fator promotor da maturação (MPF) mantendo os oócitos bovinos no estágio de vesícula germinativa. Estes inibidores têm sido adicionados durante 24 horas ao meio de MIV preservando a manutenção da viabilidade dos oócitos bovinos sem comprometimento do desenvolvimento embrionário (Mermillod et al., 2000; Kubelka et al., 2000; Lonergan et al., 2000; Ferreira et al., 2009; Quetglas et al., 2011). Entretanto, tempos diferentes de utilização destas drogas ainda não foram descritos na literatura.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da adição de inibidores da meiose oocitária durante diferentes tempos de incubação sobre o desenvolvimento e a qualidade embrionária.

Material e Métodos

Todas as substâncias utilizadas neste trabalho foram adquiridas da Sigma (Sigma-Aldrich[®], Corporation, St. Louis, MO), exceto para aquelas que são especificadas no texto.

Coleta dos ovários, punção folicular e Maturação *in vitro*

Foram utilizados ovários de vacas de abatedouro comercial e transportados ao laboratório de FIV do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP-Botucatu. No laboratório, os ovários foram lavados com NaCl a 0,9 % na temperatura de 38 °C. Todos os folículos com diâmetro entre 2-8 mm foram aspirados com seringas de 10 mL e agulhas 40 x 12 mm.

Após a seleção, os oócitos foram lavados em meio HEPES (Gibco[®]) e transferidos para gotas de maturação *in vitro* (MIV) contendo TCM 199 com sais de Earle (Gibco 31.100; Grand Island, NY, EUA) e L-glutamina suplementado com 10 % SFB, 0,2 mM piruvato de sódio, 5mg/mL LH (Lutropin-V[®], Vetrepharm, Ontário, Canadá), 1mg/mL FSH (Pluset[®], Calier, Barcelona, Espanha), e 100 mg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina.

Os oócitos foram divididos em **grupo controle** (MIV por 24 horas) e nos diferentes grupos submetidos à inibição da maturação nuclear.

Inibição meiótica

Roscovitina (Roscovitine R7772 Sigma \geq 98)

Para bloquear a meiose, a roscovitina (ROS) foi adicionada ao meio de maturação nas seguintes concentrações: 12,5 μ M e 25 μ M e por três períodos de tempo: 24 horas, 12 horas e 6 horas.

Desta forma, os grupos experimentais foram divididos em:

- **ROS 25 μ M por 24 horas** e reversão meiótica por 24 horas (MIV livre de fármaco);
- **ROS 12,5 μ M por 12 horas** e reversão meiótica por 12 horas (MIV livre de fármaco);
- **ROS 12,5 μ M por 6 horas** e reversão meiótica por 18 horas (MIV livre de fármaco).

Butirolactona I (BML-CC210-1000)

A butirolactona I (BL-I, Enzo Life Sciences International, Inc. 5120 Butler Pike Plymouth Meeting, PA 19462) foi adicionada ao meio de maturação nas seguintes concentrações: 50 μ M e 100 μ M, nos seguintes tempos: 24 horas, 12 horas e 6 horas.

Assim, os grupos experimentais foram divididos em:

- **BL-I 100 μ M por 24 horas**, com reversão da meiose por 24 horas (MIV livre de fármaco);
- **BL-I 50 μ M por 12 horas**, com reversão da meiose por 12 horas (MIV livre de fármaco);
- **BL-I 50 μ M por 6 horas**, com reversão da meiose por 18 horas (MIV livre de fármaco).

Roscovitina + Butirolactona-I

A associação de ROS (ROS 6,25 μ M) e BL-I (BL-I 25 μ M) foi utilizada durante a MIV por dois tempos, 6 e 12 horas.

Assim, foram divididos em 2 grupos:

- **ROS + BL-I por 12 horas**, com reversão da meiose por 12 horas (MIV livre de fármaco);
- **ROS + BL-I por 6 horas**, com reversão da meiose por 18 horas (MIV livre de fármaco).

Avaliação da maturação oocitária

Foi realizada a análise oocitária, pela avaliação da maturação nuclear. A maturação nuclear foi avaliada diretamente pela configuração cromossômica e classificados em diferentes estádios (Figura 2; LANDIM-ALVARENGA, 1999):

- **Vesícula germinativa (VG)**: caracterizada pela presença de núcleo esférico e definido com carioteca íntegra e filamentos de cromatina descondensados;
- **Quebra da vesícula germinativa (QVG)**: caracterizada pela cromatina condensada e ausência de membrana nuclear visível;
- **Metáfase I (MI)**: em que os cromossomos estão arranjados na placa metafásica e localizados perifericamente no ooplasma;
- **Metáfase II (MII)** caracterizado pela presença de cromossomos metafásicos na periferia do ooplasma e pela extrusão do primeiro corpúsculo polar, representado por um grupo denso de cromossomos;
- **Degenerados ou Não identificados (D/NI)**.

Os tempos analisados foram: 0, 6, 12, 24 e 48 horas de maturação com os oócitos corados por Hoechst 33342 (Invitrogen H-1399) numa concentração de

0,01mg/mL. As estruturas foram retiradas do meio MIV e transferidas ao meio TCM 199 Hepes (Gibco) com Hyaluronidase Type II (H2126) e pipetados repetidamente para retirada das células do *cumulus*.

Foram então transferidos em gota de 5 μ L de Hoechst 33342 com lâmina e cobertos com lamínula. Após 20 minutos, foram avaliados em microscópio de epifluorescência (com filtro de excitação de 340-380nm e emissão de 430nm) com aumento de 40 x.

Fertilização *in vitro*

Oócitos maturados do grupo controle e aqueles inibidos com a dose e tempo ideal dos fármacos foram inseminados *in vitro* com sêmen congelado de touro da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). O sêmen foi selecionado por gradiente Percoll (Nutricell) nas concentrações de 45% e 90%. A concentração final foi ajustada para 2 x 10⁶ espermatozóides/mL. Os oócitos foram incubados durante 18 horas, em estufa com 5% de CO₂ em ar, a temperatura de 38,5°C e umidade absoluta.

O meio de fertilização *in vitro* (FIV) era constituído por HTF (Irvine Scientific, Santa Ana, USA) acrescido de 5 mg/mL de BSA (livre de ácidos graxos, Sigma A-8806), 0,2 mM de piruvato, 30 μ g/mL de heparina, 0,5 mg/mL de cafeína, 18 μ M de penicilamina, 10 μ M de hipotaurina, e 1,8 μ M de epinefrina, 100 mg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina, sendo incubados os oócitos e espermatozóides em estufa, sob as mesmas condições da MIV, por aproximadamente 18 horas. O dia da fertilização foi considerado o dia zero (D0).

Cultivo *in vitro*

Decorridas às 18 horas de FIV, os possíveis zigotos foram desnudados e transferidos para placas de cultivo em gotas de 90 μ L do meio cobertas de óleo mineral

em estufa com umidade saturada e atmosfera de 5 % de CO₂, 5 % O₂ e 90 % N₂. O cultivo embrionário foi realizado no meio SOFaa acrescido de 2,7 mM de mio-inositol, 0,2 mM de piruvato, com 2,5 % de SFB, 5 mg/mL de BSA (livre de ácidos graxos-Sigma A-8806), 100 mg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina.

No D7 foi verificada a taxa de formação de blastocisto. Após verificar a taxa, os embriões foram fixados em paraformaldeído a 4 % para coloração com TUNEL.

Avaliação da apoptose celular - TUNEL (Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End Labeling)

Foi avaliado o índice de apoptose após 7 dias de CIV (D 0 = FIV). Foram utilizados de 10 a 15 embriões de cada grupo experimental pela técnica TUNEL[®] (Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End Labeling) que identifica *in situ*, a fragmentação internucleossômica do DNA, evento este resultante da apoptose. Esta avaliação foi realizada com o “*Kit in Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein*” (Roche[®] - 11 684 795 910, Mannheim, Alemanha).

Os embriões foram lavados em solução de lavagem (0,1 % PVP/PBS) e fixados em solução fixadora (paraformaldeído a 4 %) por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente foram permeabilizados em solução permeabilizadora (0,1 % de triton X-100 e 0,1 % citrato de sódio em PBS) por 1 hora em câmara úmida e temperatura ambiente. Os embriões foram incubados no controle positivo e negativo com a solução de DNAase (Promega, M 6101, Madison, EUA) por 1 hora à 37 °C (estufa) no escuro.

Após, o controle positivo e as amostras foram incubadas em gotas de 10 µL do MIX TUNEL em lâminas com coroa de esmalte por 1 hora a temperatura de 37 °C no escuro e em câmara úmida. O controle negativo foi incubado apenas com solução marcadora na ausência da solução enzimática para conferir a marcação.

Após serem lavados em solução de lavagem, controles e amostras foram submetidos a um contraste para visualização do DNA com solução de Hoechst 33342 (1 mg/mL) e glicerol em uma lâmina com lamínula e foram analisados em microscópio de fluorescência invertido. Com filtro de excitação de 450-490 nm e de emissão de 515 nm os núcleos fluorescentes em verde (isotiocianato de fluoresceína - FITC) foram considerados as células TUNEL positivas, ou seja, apresentaram o DNA fragmentado. Com filtro de excitação de 365 nm e de emissão de 420 nm os núcleos fluorescentes em azul (Hoechst 333342) indicaram a presença e a localização do núcleo das células.

Para a contagem do número de células apoptóticas (coradas em verde) e número total de células (coloração azul) foi utilizado o programa Image J 1.41 (Wayne Rasband National Institutes of Health, Bethesda, EUA). Com base nestes dados, foi feito o cálculo da porcentagem de ocorrência da apoptose (número de células apoptóticas em relação ao número total de células do embrião).

Análise Estatística

Para análise estatística, os dados foram analisados utilizando a ANOVA pelo PROC GLM do SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Fontes de variação no modelo incluindo tratamento e réplica foram considerados como efeito fixo e aleatório, respectivamente. Os dados são apresentados como média e desvio padrão. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 5 %.

Resultados

Foram realizadas 25 rotinas ao total (50 oócitos/tratamento), entre avaliação da maturação nuclear e avaliação da taxa de produção de blastocistos.

Roscovitina

No presente estudo o uso de 25 μ M de ROS por 24 horas inibiu a meiose em $43 \pm 6,1$ % dos oócitos e manteve $38 \pm 5,4$ % em QVG (quebra de vesícula germinativa). Este resultado foi semelhante ao observado no grupo controle (VG = 43% e QVG = 39 % - Tabela 1).

A inibição da meiose com a roscovitina por 24 horas levou a uma alta degeneração oocitária (tabela 1), uma vez que após a reversão do bloqueio $28 \pm 4,3$ % dos oócitos se encontravam degenerados, em comparação com $15 \pm 3,5$ % do controle.

Resultados superiores foram obtidos com a utilização de 12,5 μ M de roscovitina durante 12 horas, com reversão da meiose de 12 horas e principalmente com o bloqueio da meiose por 6 horas com reversão de 18 horas (Tabela 1). Nestes dois grupos o índice de QVG foi de $67,3 \pm 6,6$ % e $79,9 \pm 6,5$ %, para 12 e 6 horas, respectivamente. Estes dados foram superiores ao observado no grupo controle, em que $39 \pm 6,5$ % dos oócitos encontravam-se em QVG.

Os índices de maturação nuclear após a reversão do bloqueio foram superiores ao encontrado no grupo controle, tanto com a utilização de 12 como de 18 horas de incubação, sendo de $63,2 \pm 7,7$ % e $77,7 \pm 6,4$ %, respectivamente. O índice de M II no grupo controle foi de $45 \pm 6,5$ %.

O índice de degeneração oocitária obtido no grupo com inibição por 12 horas elevado ($22 \pm 5,1$ %) em comparação ao grupo 6 horas ($7,5 \pm 6,7$ %), entretanto estes dados foram inferiores aos do grupo controle, o qual apresentou degeneração de $15 \pm 3,5$ %. Da mesma forma a inibição da meiose com ROS 12,5 μ M por 12 horas (QVG = $67,3 \pm 6,6$ %) apresentou resultados inferiores aos obtidos na inibição por 6 horas (QVG = $79,9 \pm 6,5$ %).

A produção de embriões utilizando-se um tempo de bloqueio de 12 horas, com reversão de 12 horas foi mais baixa (38,89 %) em comparação ao grupo controle (51,18

% - Tabela 5; $P < 0,05$). No entanto, quando foi utilizado um tempo de inibição de 6 horas e reversão da meiose por 18 horas (Tabela 4), a taxa de produção embrionária utilizando-se ROS 12,5 μM (41,33 %; $P > 0,05$) e ROS 25 μM (41,49 %; $P > 0,05$) foi similar ao grupo controle (43,83 % - Tabela 5).

Com relação ao índice de apoptose celular dos embriões produzidos *in vitro*, inibidos com roscovitina (12,5 μM) verificou-se um número maior de células apoptóticas utilizando-se um tempo de bloqueio por 12 horas (18,8 - Tabela 6; $P = 0,6$) em comparação ao bloqueio da meiose por 6 horas (12,2 - Tabela 6; $P = 0,17$), entretanto não foi observada diferença estatística entre os grupos nem entre estes e o controle.

Butirolactona-I

No presente experimento a BL-1 (100 μM) não foi eficiente em manter os oócitos em bloqueio da meiose, uma vez que ao final do período de 24 horas $49,3 \pm 7,2$ % já se encontravam em MI (tabela 2). No entanto, quando se reduziu a concentração de BL-I para 50 μM com bloqueio mantido por 12 horas $71,2 \pm 6,6$ % dos oócitos apresentaram-se em QVG e com bloqueio de 6 horas, este índice foi de $81,2 \pm 6,5$ % (tabela 2).

Após a reversão do bloqueio de 12 horas $61,8 \pm 7,8$ % dos oócitos se encontravam em MII e após 6 horas de bloqueio $78,8 \pm 6,4$ % dos oócitos retomaram a meiose. Estes índices foram superiores ao encontrado no grupo controle ($45 \pm 6,5$ %).

A inibição da meiose com a BL-I na concentração de 100 μM por 24 horas também acarretou em degeneração oocitária de $43,3 \pm 5,6$ % (Tabela 2), o que levou a modificação do protocolo com redução da dose para 50 μM .

A inibição da meiose com BL-I 50 μM por 12 horas também resultou em altos índices de degeneração oocitária ($24 \pm 5,1$ %) em comparação ao grupo controle ($15 \pm$

3,5 %). Por outro lado, quando se utilizou o tempo de inibição de 6 horas e reversão de 18 horas, os índices de degeneração foram baixos ($5,4 \pm 5,1$ %).

O índice de produção de embriões observado após a inibição da maturação por 12 horas, com reversão de 12 horas utilizando-se $50 \mu\text{M}$ de BL-1 foi mais baixa (40,28 %; $P > 0.05$) em comparação ao grupo controle (51,18 % - Tabela 5). No entanto, quando o tempo de 6 horas com reversão de 18 horas foi utilizado, a taxa de formação de blastocisto com a concentração de $50 \mu\text{M}$ foi similar ao grupo controle (41,87 % BL-I $50 \mu\text{M}$ x 43,83 % C; $P > 0.05$ - Tabela 4), o mesmo ocorrendo com o grupo com concentração de $100 \mu\text{M}$ (41,90 %) ($P > 0.05$).

Com relação ao índice de apoptose celular dos embriões produzidos *in vitro*, inibidos com BL-I ($50 \mu\text{M}$) verificou-se um número maior de células apoptóticas, porém não observamos diferença estatística, utilizando-se um tempo de bloqueio por 12 horas (17,6 %; $P = 0.58$ - Tabela 6) em comparação ao bloqueio da meiose por 6 horas.

Butirolactona I + Roscovitina

No presente experimento, após o bloqueio da meiose com a associação de BL-I ($25 \mu\text{M}$) + ROS ($6,25 \mu\text{M}$) por 12 horas seguidas de 12 horas de maturação livre de fármacos, foi encontrado um índice de maturação nuclear (MII) de $62,4 \pm 7,8$ % superior ao controle ($45 \pm 6,5$ % - Tabela 3). No entanto, o índice de degeneração oocitária foi alto ($23,5 \pm 5,1$ %). Desta forma testou-se a inibição por 6 horas com reversão da meiose por 18 horas em meio de maturação livre de BL-I + ROS. Com a utilização deste protocolo obtivemos $72,4 \pm 6,4$ % de MII comparado a $45 \pm 6,5$ % do controle (Tabela 3). Neste grupo o índice de degeneração oocitária foi de $9,5 \pm 6,6$ %.

O grupo bloqueado com BL-1 + ROS por 12 horas apresentou menor taxa de produção embrionária (36,62 %) quando comparado ao grupo controle (51,18 % - Tabela 5; $P < 0,05$). Já os resultados de produção embrionária com 6 horas de bloqueio

e 18 horas de reversão não mostraram diferença estatística, sendo o grupo BL-I + ROS similar ao grupo controle (44,11 % para o tratado x 43,83 % para o controle; $P < 0.05$ - Tabela 4).

Com relação ao índice de apoptose celular dos embriões produzidos *in vitro*, inibidos pela associação de BL-I + ROS verificou-se um número maior de células apoptóticas utilizando-se um tempo de bloqueio por 6 horas (22,6 $P = 0.75$ - Tabela 6) em comparação ao bloqueio da meiose por 12 horas (21,2 - Tabela 6), porém não se observou diferença estatística.

Discussão

A eficiência da produção *in vitro* de embriões mantém-se baixa apesar dos esforços para compreender os efeitos da composição e suplementação dos meios nas condições de cultivo. Como os oócitos bovinos retomam a meiose espontaneamente e precocemente em meio de cultivo, após a aspiração folicular, a hipótese da inibição da meiose *in vitro* antes da MIV e FIV permitiria que mais oócitos adquirissem competência para o desenvolvimento.

Roscovitina

Este trabalho avaliou o efeito de diferentes doses e tempo de inibição da meiose oocitária com a utilização da ROS sobre a taxa de formação de blastocistos. Observamos que a ROS utilizada em altas concentrações (50 μM) e por longo período (24 horas) acarretou em elevada taxa de degeneração oocitária ($28 \pm 4,3$ % tabela 1). Outros autores utilizaram esta mesma concentração com tempo similar de inibição meiótica e relataram dados diferentes aos obtidos neste estudo, afirmando que a ROS foi eficiente em manter os oócitos bovinos em estágio de vesícula germinativa sem

acarretar em degeneração celular (Mermillod et al., 2000; Lagutina et al., 2002; Barretto et al., 2010).

As razões para estas diferenças não foram encontradas, no entanto, após vários testes realizados, a manutenção de elevadas taxas de degeneração continuaram. Desta forma decidiu-se então reduzir a concentração de ROS para 12,5 μ M e com tempos de 6 e 12 horas de inibição meiótica com respectiva reversão de 18 e 12 horas, para a avaliação das taxas de produção de embriões.

O tempo para o bloqueio da meiose foi definido conforme estudos anteriores (Sirard e First, 1988; Sirard et al., 1989), os quais demonstraram que a QVG ocorre entre 6 e 9 horas após o início da MIV (Bilodeau-Goeseels, 2006).

Já foi relatado que logo após a aspiração folicular, um grande número de oócitos podem se encontrar em QVG (Sirard e First, 1988). Isto foi observado no presente estudo e em outros realizados em nosso laboratório. Foram detectados elevados números de oócitos com núcleo em QVG imediatamente após a aspiração folicular ($39 \pm 6,5$ % dos oócitos aspirados). Uma possível explicação para este fato seria a demora do abate até o laboratório, favorecendo a maturação precoce, pelos processos *post-mortem* do animal. Outra explicação pode ser o critério utilizado para definição de QVG, onde o simples ondulamento da membrana nuclear e início da condensação dos cromossomos já eram considerados como o início do processo de meiose.

Outro fato importante é que o bloqueio foi realizado na presença do FSH, o qual pode atuar como ativador da PDE induzindo parcialmente a degradação de cAMP, e portanto favorecendo a maturação oocitária, apesar da presença dos fármacos inibidores da meiose.

Da mesma forma que o observado no grupo controle, a utilização de ROS por 6 ou 12 horas não foi capaz de evitar o início da maturação nuclear. No grupo em que se

utilizou ROS por 6 horas, $79,9 \pm 6,5$ % dos oócitos já se encontravam em QVG, similar ao observado no grupo inibido por 12 horas, em que $67,3 \pm 6,6$ % dos oócitos apresentaram-se em QVG.

Os mecanismos envolvidos no controle da inibição da meiose e sua progressão não são completamente compreendidos. No entanto, em oócitos de camundongos, a composição dos meios afeta a maturação *in vitro*. A presença de fontes de energia específicas, suas combinações e concentrações influenciam as taxas de maturação nuclear espontânea e a eficiência de utilização de fármacos utilizados para inibir a MIV. Algumas moléculas que são capazes de inibir a maturação nuclear em oócitos de camundongos, não são eficazes em oócitos bovinos (Downs e Verhoeven et al, 2003).

Assim, são necessárias concentrações de fármacos superiores, aumentando o número de oócitos degenerados. Em geral, estudos que controlam a meiose ou a aquisição de competência para o desenvolvimento oocitário utilizam meio TCM 199 contendo SFB. Talvez a alteração da composição do meio permitisse a inibição mais eficiente da maturação nuclear de oócitos bovinos. Ademais, poucos trabalhos publicados relatam os efeitos da composição do meio sobre a ação dos inibidores em manter a parada meiótica de oócitos bovinos (Bilodeau-Goeseels, 2006).

Até o momento, nenhum trabalho utilizou o tempo de inibição da meiose por 6 ou 12 horas, com reversão da inibição por 18 ou 12 horas em oócitos bovinos na concentração de ROS ($12,5 \mu\text{M}$), conforme utilizada neste experimento, para a produção *in vitro* de embriões bovinos. Neste caso, a ROS mostrou-se totalmente reversível e capaz de produzir embriões com taxas similares ao grupo controle quando utilizada por 6 horas (Tabela 4).

Outros autores relataram dados inferiores nas taxas de produção de embriões com a utilização de ROS ($25 \mu\text{M}/24$ horas). Adona e Leal (2004) obtiveram 35 % de

blastocistos (D8) no controle, enquanto que o grupo tratado com ROS obteve-se 24,2 % de blastocistos. No presente estudo, verificamos que a inibição meiótica com ROS utilizada por 12 horas, também afetou a taxa de produção embrionária, sendo inferior ao grupo controle.

Em contrapartida, trabalhos mostram que a ROS foi eficiente na produção *in vitro* de embriões bovinos, sem alteração da competência oocitária. Barretto et al. (2010) relataram taxas de produção de embriões similares entre o grupo controle ($29,6 \pm 6,6$ %) e aqueles em que foi utilizada ROS na concentração de $25 \mu\text{M}$ por diferentes momentos: 16, 20 e 24 horas na MIV ($35,2 \pm 6,8$ %, $31,7 \pm 2,0$ % e $33 \pm 4,7$ %, respectivamente).

Mermillod et al. (2000) apresentaram dados similares nas taxas de produção de embriões entre oócitos do grupo controle e tratado com ROS na concentração de $25 \mu\text{M}$ por 24 horas, durante a MIV. Estes autores encontraram taxa de formação de blastocisto de 23 ± 6 % para o grupo controle (D7) e de 18 ± 5 % para o grupo tratado com ROS. Outros estudos também relatam similaridade na produção de embriões utilizando ROS ($25 \mu\text{M}/24$ horas). Lagutina et al. (2002) encontraram 37,2 % de blastocistos (D7) no grupo controle e 48,5 % no grupo tratado. Entretanto, no presente estudo, não podemos fazer uma comparação direta entre artigos, visto que as doses e tempo de inibição utilizando ROS foram diferentes aos já relatados na literatura.

Quando Imai et al. (2002) avaliaram o número total de células em embriões que foram bloqueados com a BL-I por 24 horas e revertidos por 20 horas, não encontraram diferenças. Lonergan et al. (2000); Mermillod et al. (2000); Adona et al. (2008) também não encontraram diferença no número total de células. Esses resultados estão de acordo com o presente experimento, em que independente do tempo de inibição utilizada de

ROS para bloquear a meiose, o número total de células se manteve igual ao grupo controle.

Butirolactona I

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da adição da BL-I em diferentes concentrações e tempos, na taxa de formação de blastocistos bovinos.

Estudos anteriores demonstraram que a incubação com BL-I por 24 horas bloqueou a progressão da meiose em 90 % dos oócitos e mostrou-se altamente reversível (Kubelka et al., 2000; Hashimoto et al, 2002; Adona e Leal, 2004). No presente estudo, quando se utilizou a dose de 100 μ M por 24 horas, observamos que este fármaco não foi eficiente em bloquear a meiose, uma vez que $49,3 \pm 7,2$ % dos oócitos já se encontravam em M I após 24 horas de inibição com BL-I.

Além disso, foi observada alta taxa de degeneração oocitária com o uso de BL-I por 24 horas, na concentração de 100 μ M ($44,5 \pm 5,6$ %) e após a reversão da meiose (meio livre de BL-I) $43,3 \pm 5,6$ % dos oócitos estavam degenerados. Estes resultados contrastam com os de Ferreira et al. (2009) que observaram somente 4,8 % dos oócitos degenerados após 18 horas de incubação e 2,6 % após 24 horas de inibição.

Quando se reduziu a concentração de BL-I para 50 μ M, tanto para a inibição por 6, quanto por 12 horas diminuiu-se o número de oócitos degenerados, sendo $0,4 \pm 1,0$ % para os inibidos por 6 horas e $5,4 \pm 5,1$ % para oócitos inibidos por 12 horas.

Neste caso também verificou-se que após o bloqueio por 6 horas com BL-I $81,2 \pm 6,5$ % dos oócitos encontravam-se em QVG, sendo este índice de $71,2 \pm 6,6$ % para oócitos inibidos por 12 horas. A porcentagem de oócitos em QVG no grupo controle foi de $39 \pm 6,5$ %. Da mesma forma como o discutido anteriormente acreditamos que os oócitos devem iniciar o processo de maturação logo após a aspiração folicular e isso influencia os índices de QVG.

Com relação à taxa de produção embrionária, a utilização de BL-I na concentração de 50 μ M por 6 horas resultou em uma taxa de produção embrionária (41,87 % de blastocistos - D7) similar ao grupo controle (43,83 %). Estes dados estão de acordo aos relatados por outros autores em que a utilização de BL-I acarretou a mesma taxa de produção embrionária do grupo livre de fármaco (Lonergan et al., 2000; Kubelka et al., 2000; Adona e Leal, 2004; Adona et al, 2008).

Adona et al. (2008) obtiveram 31,3 % de blastocistos (D7) no grupo tratado com BL-I e 36,5 % de blastocistos (D7) no grupo controle, utilizando 100 μ M de BL-I por 24 horas. Da mesma forma, Lonergan et al. (2000) relataram taxas de blastocistos similares, entre grupo controle e tratado com BL-I sendo, 28,4 % de blastocistos (D8) no grupo controle e 27 % no grupo tratado com 100 μ M de BL-I por 24 horas. Estes dados divergem aos obtidos no presente estudo quando utilizamos um tempo de inibição meiótica de 12 horas, em que a taxa de formação de blastocistos foi bem inferior ao grupo controle (BL-I = 40,28 % x C = 51,18 %).

Hashimoto et al. (2002) observaram que tempo para a maturação nuclear de oócitos tratados com BL-I é menor do que aqueles não tratados. A capacidade de desenvolvimento dos oócitos tratados mostrou-se superior ao grupo controle quando o meio de cultivo foi suplementado com SFB sob baixa tensão de oxigênio, igualmente ao realizado no nosso estudo. Estes mesmos autores sugerem que oócitos imaturos necessitam de tempo maior para adquirir a capacidade de desenvolvimento antes da maturação meiótica. A combinação de SFB e a diminuição da tensão de oxigênio durante a inibição meiótica criam condições favoráveis para permitir que oócitos incompetentes, adquiram capacidade de desenvolvimento. No entanto, estes autores afirmam que mais análises moleculares e genéticas são necessárias para compreender o mecanismo dessa melhoria.

O total de células embrionárias não diferiu entre os tratamentos (Tabela 6) assim, como o total de células apoptóticas. A melhor forma para se avaliar a qualidade embrionária é pelo índice de apoptose celular, sendo que a alta incidência desta está associada com a redução da viabilidade embrionária (Byrne et al., 1999).

A apoptose de células embrionárias tem recebido uma crescente atenção, principalmente devido ao seu papel em resposta às condições de subdesenvolvimento. Assim, o aumento da apoptose celular consiste num indicador de condições inadequadas de cultivos *in vitro* para oócitos e embriões (Kim et al., 2008).

Butirolactona I + Roscovitina

A associação de BL-I e ROS vêm sendo utilizada para bloquear a QVG de oócitos bovinos, em concentrações menores ao uso das drogas isoladamente. No presente estudo, utilizamos a associação destes fármacos em 2 tempos de inibição, por 6 e 12 horas, com reversão do bloqueio por 18 e 12 horas, respectivamente. Diminuímos a concentração dos fármacos pela metade, sendo 25 μ M de BL-I e 6,25 μ M de ROS.

Já foi relatado que a associação destes fármacos, na mesma concentração utilizada no nosso estudo, foi capaz de manter 100 % dos oócitos em VG, sem comprometer o desenvolvimento embrionário posterior (Ponderato et al., 2001). Entretanto, no presente estudo a associação dos fármacos não foi eficiente em manter os oócitos em VG, visto o elevado índice de oócitos em QVG, tanto com 6 como 12 horas de inibição. Apesar disso, esta associação mostrou-se eficiente em reverter a meiose, sendo $72,4 \pm 6,4$ % dos oócitos em MII no grupo inibido por 6 horas e $62,4 \pm 7,8$ % dos oócitos em MII no grupo inibido por 12 horas. Outros autores também mostram que a associação dos fármacos foi eficiente em manter os oócitos em VG (Ponderato et al., 2001; Lonergan et al., 2003; Adona et al., 2008).

Quando analisamos os dados obtidos no presente estudo, verificamos que a taxa de oócitos em MII após a inibição, foi sempre superior ao grupo controle. As razões para esta aceleração não são claras, mas tem-se sugerido que durante o bloqueio da meiose acumulam-se fatores relacionados ao controle do ciclo celular e que nem todos os eventos da maturação são bloqueados (Vigneron et al., 2004a, b). As consequências de tal aceleração no desenvolvimento posterior também são desconhecidas, mas não parecem ser prejudiciais, uma vez que os oócitos tratados com inibidores são capazes de produzir blastocistos em taxas similares ao grupo controle.

As taxas de embriões obtidas com a associação dos fármacos por 6 horas durante a MIV foram similares ao grupo controle, sendo de 44,11 % e o grupo controle de 43,83 %. Estes dados mostram que a utilização destas drogas associadas não comprometeu o desenvolvimento embrionário.

Adona et al. (2008) observaram dados similares entre o grupo controle e o tratado, quando utilizou BL-I + ROS no meio de MIV durante 24 horas. Demais autores, relatam também similaridade entre os grupos tratados e controle (Ponderato et al., 2001). Porém, no presente estudo, quando esta associação foi realizada por 12 horas, verificamos uma queda na produção embrionária.

Conclusão

O bloqueio da meiose, da forma utilizada no presente experimento, se mostrou totalmente reversível e interferiu nos índices de produção embrionária. Observamos que os fármacos utilizados em concentrações e tempos similares aos relatados na literatura científica, não foram eficientes e acarretaram altos índices de degeneração oocitária. Ao reduzirmos a dose e o tempo de inibição, o grupo controle apresentou taxas de produção

embrionária similares aos grupos tratados por 6 horas de inibição meiótica e reversão por 18 horas.

Embora os resultados obtidos até o momento não reforcem a hipótese inicial, de que o bloqueio meiótico seria uma vantagem na melhoria da qualidade embrionária, o protocolo utilizado por 6 horas de inibição, facilita o manejo dos oócitos para o uso em programas comerciais de produção de embriões *in vitro*, uma vez que permite o transporte, bem como a sincronização do momento da fertilização de oócitos de diferentes animais.

Referências

Adona PR, Leal CLV, 2004: Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. *Zygote* **12**, 197-204.

Adona PR, Pires PRL, Quetglas MD, Schwarz KRL, Leal CLV, 2008: Nuclear maturation kinetics and *in vitro* embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitina. *Animal Reprod Sci* **104**, 389-397.

Albarraci'n JL, Morat_o R, Izquierdo D, Mogas T, 2005: Effects of roscovitine on the nuclear and cytoskeletal components of calf oocytes and their subsequent development. *Theriogenology* **64**, 1740-1755.

Bilodeau-Goeseels, S 2012: Bovine oocyte meiotic inhibition before *in vitro* maturation and its value to *in vitro* embryo production: does it improve developmental competence? *Reprod Dom Anim* **47**, 687-693.

Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ, 1999: Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J Reprod Fertil* **117**, 97-105.

Gilchrist RB, 2011: Recent insights into oocyte follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to *in vitro* maturation. *Reprod Fertil Dev* **23**, 23-31.

Gilchrist RB, Thompson JC, 2007: Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potencial *in vitro*. *Theriogenology* **67**, 6-15.

Gjorret JO, Knijn HM, Dieleman SJ, Avery B, Larsson Lars-Inge, Maddox-Hyttel Poul, 2003: Chronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Biol Reprod* **69**, 1193-1200.

Hashimoto S, Minami N, Takaura R, Imai H, 2002: Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest *in vitro*. *Biol Reprod* **66**, 1696-1701.

Imai K, Kobayashi S, Kaneyama K, Kojima T, Nagai T, 2002: Effects of butyrolactone-I on GVBD in bovine oocytes and subsequent maturation, fertilization and development *in vitro*. *J Reprod Devel* **48**, 249-255.

Kim Chi-Gu, Yong H, Lee G, Cho J, 2008: Effect of the polyvinylpyrrolidone concentration of cryoprotectant on mouse embryo development and production of pups: 7.5 % of PVP is beneficial for *in vitro* and *in vivo* development of frozen-thawed mouse embryos. *J Reprod Dev* **54** 250-253.

Kubelka M, Motlík J, Schultz RM, Pavlok A, 2000: Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. *Biol Reprod* **62**, 292-302.

Long CR, 2008: Eclosão assistida a laser em embriões bovinos produzidos *in vitro* para melhorar os índices de prenhez. *Acta Sci Vet* **36 (2)**, 311-318.

Lonergan P, Faerge I, Hyttel PM, Boland M, Fair T, 2003: Ultrastructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest *in vitro* using roscovitine or butyrolactone. *Mol Reprod Dev* **64**, 369-378.

Mermillod P, Tomanek M, Marchal R, Meijer L, 2000: High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF Kinase Activity. *Mol Reprod Dev* **55**, 89-95.

Ponderato N, Lagutina I, Crotti G, Turini P, Galli C, Lazzari G, 2001: Bovine oocytes treated prior to *in vitro* maturation with a combination of butyrolactone I and roscovitine at low doses maintain a normal developmental capacity. *Mol Reprod Dev* **60**, 579-585.

Quetglas MD, Adona PR, de Bem THC, Pires PRL, Leal CLV, 2010: Effect of cyclin-dependent Kinase (CDK) inhibition on expression, localization and activity of maturation promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) in bovine oocytes. *Reprod Dom Anim* **45**, 1074-1081.

Sirard MA, 2001. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, **55**, 1241-1254.

Vigneron C, Perreau C, Dalbiès Tran, Joly C, Humblot P, Uzbekova S, Mermillod P, 2004a: Protein synthesis and mRNA storage in cattle oocytes maintained under meiotic block by roscovitine inhibition of MPF activity. *Mol Reprod Dev* **69**, 457-465.

Vigneron C, Perreau C, Dupont J, Uzbekova S, Pringent C, Mermillod P, 2004b: Several signaling pathways are involved in the control of cattle oocyte maturation. *Mol Reprod Dev* **69**, 466-474.

Tabela 1: Resultados (média \pm desvio padrão) de estágios de desenvolvimento temporal de oócitos bovinos, após MIV em meio contendo Roscovitina em diferentes concentrações e tempos de exposição.

GRUPOS	Taxas (%) dos estádios de maturação nuclear				
	VG	QVG	MI	MII	D/NI
Imaturo	43 \pm 8,2	39 \pm 6,5	11 \pm 7,0	3 \pm 1,2	1 \pm 1,0
C 6h	9,4 \pm 3,2	53,0 \pm 6,5	29,9 \pm 6,4	4,1 \pm 2,1	3,6 \pm 2,1
ROS 12,5 - 6h	1,3 \pm 0,9	79,9 \pm 6,5	11,0 \pm 6,4	1,1 \pm 1,5	6,7 \pm 3,4
ROS 6h / Rev. 18h	1,1 \pm 1,1	0,2 \pm 1,3	13,5 \pm 7,2	77,7 \pm 6,4	7,5 \pm 6,7
C 12h	10,2 \pm 3,1	53,0 \pm 6,6	29,9 \pm 5,5	4,3 \pm 1,2	2,6 \pm 2,3
ROS 12,5 - 12h	15,1 \pm 3,1	67,3 \pm 6,6	10,0 \pm 5,5	0,9 \pm 1,2	6,7 \pm 5,1
ROS 12h/Rev. 12h	1,1 \pm 1,1	1,2 \pm 2,1	12,5 \pm 5,5	63,2 \pm 7,7	22,0 \pm 5,1
C 24h	9 \pm 6,7	6 \pm 3,4	24 \pm 4,5	45 \pm 6,5	15 \pm 3,5
ROS 25 - 24h	43 \pm 6,1	38 \pm 5,4	14 \pm 3,2	0 \pm 1,1	25 \pm 5,2
ROS 25-24h/Rev.24h	18 \pm 4,3	10 \pm 6,4	20 \pm 4,8	25 \pm 4,0	28 \pm 4,3

Vesícula Germinativa (VG), Quebra da Vesícula Germinativa (QVG), Metáfase I (MI), Metáfase II (MII) e Degenerado ou Não Identificado (D/NI).

Tabela 2: Resultados (média \pm desvio padrão) de estágios de desenvolvimento temporal de oócitos bovinos, após MIV em meio contendo Butirolactona I em diferentes concentrações e tempos de exposição.

GRUPOS	Taxas (%) dos estádios de maturação nuclear				
	VG	QVG	MI	MII	D/NI
Imaturo	43 \pm 8,2	39 \pm 6,5	11 \pm 7,0	3 \pm 1,2	1 \pm 1,0
C 6h	9,4 \pm 3,2	53,0 \pm 6,5	29,9 \pm 6,4	4,1 \pm 2,1	3,6 \pm 2,1
BL-I 50 - 6h	2,1 \pm 0,9	81,2 \pm 6,5	14,6 \pm 6,4	1,7 \pm 1,5	0,4 \pm 1,0
BL-I 6h / Rev. 18h	1 \pm 1,2	2,1 \pm 1,3	12,7 \pm 7,2	78,8 \pm 6,4	5,4 \pm 6,6
C 12h	10,2 \pm 3,1	53,0 \pm 6,6	29,9 \pm 5,5	4,3 \pm 1,2	2,6 \pm 2,3
BL-I 50 - 12h	7,7 \pm 3,1	71,2 \pm 6,6	14,6 \pm 5,5	1,1 \pm 1,2	5,4 \pm 5,1
BL-I 12h /Rev. 12h	1 \pm 1,1	1,5 \pm 2,1	11,7 \pm 5,5	61,8 \pm 7,8	24,0 \pm 5,1
C 24h	9 \pm 6,7	6 \pm 3,4	24 \pm 4,5	45 \pm 6,5	15 \pm 3,5
BL-I 100 - 24h	0 \pm 1,1	4,3 \pm 6,6	49,3 \pm 7,2	1,9 \pm 4,4	44,5 \pm 5,6
BL-I 100 24h / Rev.18h	0,8 \pm 1,1	4,8 \pm 6,6	29,1 \pm 7,2	22,0 \pm 4,4	43,3 \pm 5,6

Vesícula Germinativa (VG), Quebra da Vesícula Germinativa (QVG), Metáfase I (MI), Metáfase II (MII) e Degenerado ou Não Identificado (D/NI).

Tabela 3: Resultados (média \pm desvio padrão) de estágios de desenvolvimento temporal de oócitos bovinos, após MIV em meio contendo Roscovitina + Butirolactona I em diferentes concentrações e tempos de exposição.

GRUPOS	Taxas (%) dos estádios de maturação nuclear				
	VG	QVG	MI	MII	D/NI
Imaturo	43 \pm 3,2	39 \pm 6,5	11 \pm 7,0	3 \pm 1,2	1 \pm 1,0
C 6h	9,4 \pm 3,2	53,0 \pm 6,5	29,9 \pm 6,4	4,1 \pm 2,1	3,6 \pm 2,1
ROS + BL-I - 6h	7,5 \pm 0,9	73,6 \pm 6,5	16,2 \pm 6,4	2,0 \pm 1,8	0,7 \pm 1,0
ROS+BL 6h/Rev. 18h	1 \pm 1,2	1,2 \pm 1,3	15,9 \pm 7,2	72,4 \pm 6,4	9,5 \pm 6,6
C 12h	10,2 \pm 3,1	53,0 \pm 6,6	29,9 \pm 5,5	4,3 \pm 1,2	2,6 \pm 2,3
ROS + BL-I - 12h	2,9 \pm 3,1	70,6 \pm 6,6	16,1 \pm 4,3	2,5 \pm 1,2	7,9 \pm 5,1
ROS+BL12h/Rev12h	1 \pm 1,1	2,2 \pm 2,1	10,9 \pm 6,5	62,4 \pm 7,8	23,5 \pm 5,1
C 24h	9 \pm 6,7	6 \pm 3,4	24 \pm 4,5	45 \pm 6,5	15 \pm 3,5

Vesícula Germinativa (VG), Quebra da Vesícula Germinativa (QVG), Metáfase I (MI), Metáfase II (MII) e Degenerado ou Não Identificado (D/NI).

Tabela 4: Taxa de formação de blastocistos (%) avaliados no D7 com inibição meiótica utilizando ROS, BL-I e associação de ROS + BL-I por 6 horas e reversão da meiose por 18 horas.

GRUPOS	N de Blastocistos por Estágio de						Total	%
	Desenvolvimento							
	Mo	Bi	Bl	Bx	Bn	Be		
C 24h	41	53	60	49	18	42	600	43,83
ROS 12,5 - 6h	44	41	54	23	8	35	496	41,33
ROS 25 - 6h	21	22	9	4	4	1	147	41,49
BL-I 100 - 6h	30	22	32	23	7	18	315	41,90
BL-I 50 - 6h	24	31	34	10	4	13	277	41,87
ROS + BL-I - 6h	15	25	17	6	0	12	170	44,11

(P > 0,05).

Grupos: **C 24h:** blastocistos controle maturados com 24 horas; **ROS 12,5 - 6h:** blastocistos bloqueados na maturação com roscovitina 12,5 µM por 6 horas com reversão do bloqueio por 18 horas; **ROS 25 - 6h:** blastocistos bloqueados na maturação com roscovitina 25 µM por 6 horas com reversão do bloqueio por 18 horas; **BL-I 50 - 6h:** blastocistos bloqueados na maturação com butirolactona-I 50 µM por 6 horas com reversão do bloqueio por 18 horas; **BL-I 100 - 6h:** blastocistos bloqueados na maturação com butirolactona-I 100 µM por 6 horas com reversão do bloqueio por 18 horas; **ROS + BL-I 6h:** blastocistos bloqueados na maturação com roscovitina 12,5 µM + butirolactona-I 25 µM por 6 horas com reversão do bloqueio por 18 horas.

Tabela 5: Taxa de formação de blastocistos avaliados no D7 com inibição meiótica por 12 horas e reversão da meiose por 12 horas.

GRUPOS	N de Blastocistos por Estágio de Desenvolvimento						Total Oócitos	%
	Mo	Bi	Bl	Bx	Bn	Be		
C 24h	24	17	34	30	8	17	254	51,18 ^a
ROS 12,5 – 12 h	24	16	20	11	1	5	198	38,89 ^b
BL-I 50 – 12 h	22	14	24	13	5	7	211	40,28 ^b
ROS + BL-I 12 h	11	10	12	16	1	2	142	36,62 ^b

^{ab}Médias com sobrescritos incomuns, na mesma coluna, diferem ($P < 0,05$).

Grupos: C 24h: blastocistos controle maturados com 24 horas; ROS 12,5 - 12h: blastocistos bloqueados na maturação com roscovitina 12,5 μ M por 12 horas com reversão do bloqueio por 12 horas; BL-I 50 – 12h: blastocistos bloqueados na maturação com butirolactona-I 50 μ M por 12 horas com reversão do bloqueio por 12 horas; ROS + BL-I 12h: blastocistos bloqueados na maturação com roscovitina 6,25 μ M + butirolactona-I 12,5 μ M por 12 horas com reversão do bloqueio por 12 horas.

Tabela 6. Média do número total de células/embrião e taxa de células lesionadas dos blastocistos expandidos nos tratamentos de 6 horas de inibição e 18 horas de reversão da meiose e nos tratamentos de 12 horas de inibição e de 12 horas de reversão da meiose.

GRUPOS	6 horas		12 horas		P
	n total de células	% células lesionadas	n total de células	% células lesionadas	
Controle	88,2	10,6	96	17	0.0545
ROS 12,5	90,7	12,2	93,4	18,8	0.175
BL 50	150	9	126	17,6	0.5868
BR	121,3	22,6	134,8	21,2	0.7502

Grupos: C 24h: blastocistos controle maturados com 24 horas; ROS 12,5: blastocistos bloqueados na maturação com ROS 12,5 μ M BL-I 50: blastocistos bloqueados na maturação com BL-I 50 μ M ROS + BL-I 6h: blastocistos bloqueados na maturação com ROS 6,25 μ M + BL-I 12,5 μ M.

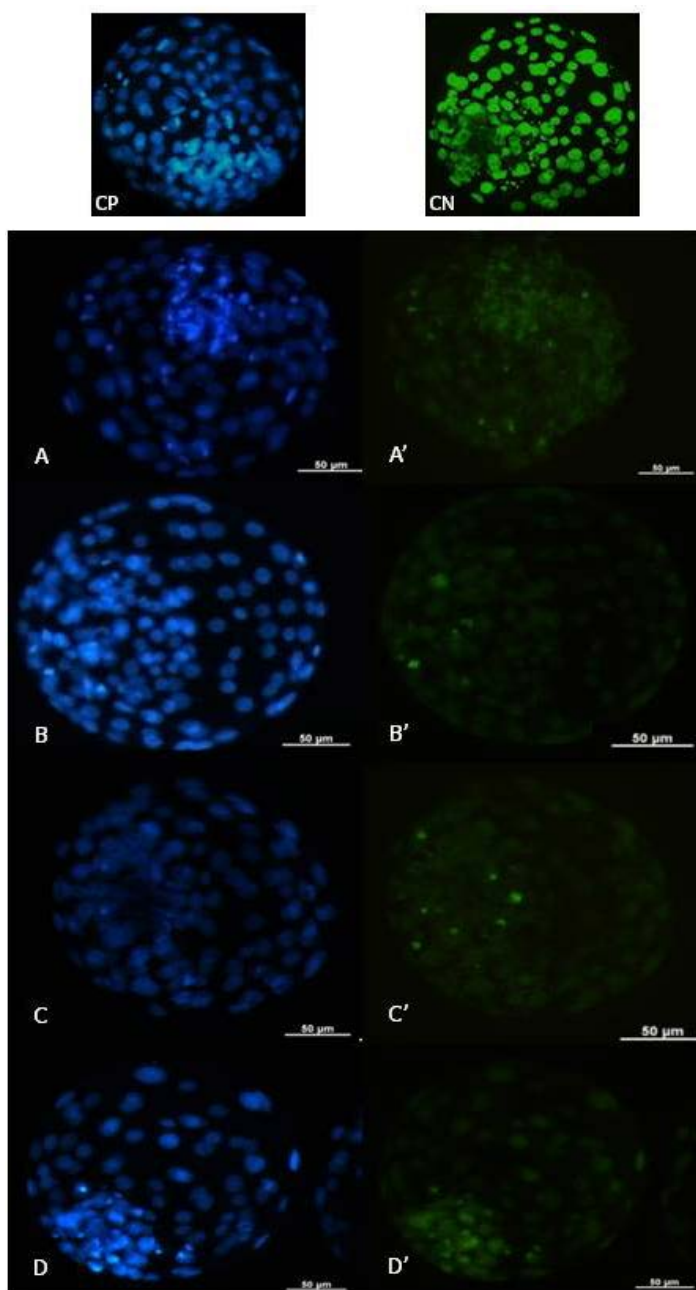


FIGURA 1: Embriões bovinos dos diferentes grupos submetidos à técnica TUNEL avaliados em microscópio de fluorescência invertido. **CN:** controle negativo da técnica; **CP:** controle positivo da técnica. **A e A':** grupo Controle; **B e B':** grupo BL-150 μM 6 h; **C e C':** grupo ROS 12,5 μM 6 h; **D e D':** grupo ROS + BL-I (6,25 μM .+ 25 μM) 6 h. Coloração azul (Hoescht) representa o número total de células íntegras. Coloração verde (FITC) indica o DNA fragmentado de células apoptóticas. Aumento de 400 x. Barra: 100 μm .

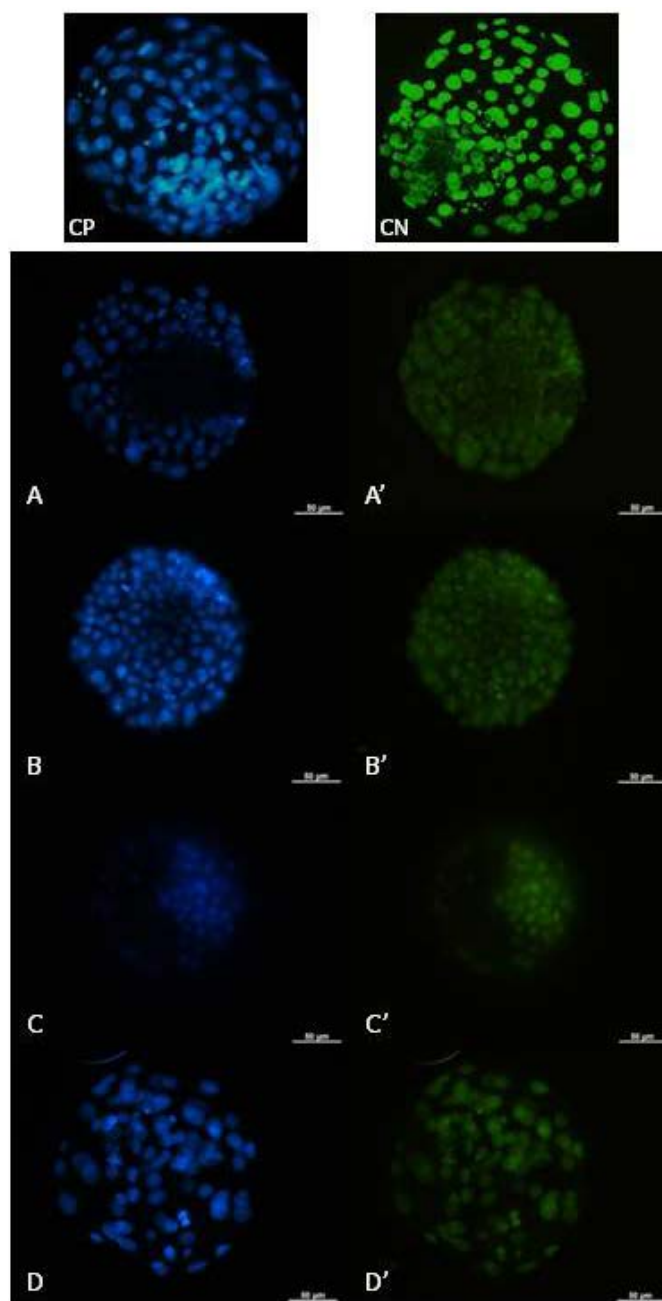


FIGURA 2: Embriões bovinos dos diferentes grupos submetidos à técnica TUNEL avaliados em microscópio de fluorescência invertido. **CN:** controle negativo da técnica; **CP:** controle positivo da técnica. **A e A':** grupo Controle; **B e B':** grupo BL-I 50 µM 12 h; **C e C':** grupo ROS 12,5 µM 12 h; **D e D':** grupo ROS + BL-I (6,25 µM.+ 25 µM) 12 h. Coloração azul (Hoescht) representa o número total de células íntegras. Coloração verde (FITC) indica o DNA fragmentado de células apoptóticas. Aumento de 400 x. Barra: 100 µm.

Capítulo 3

Trabalho a ser enviado

“Vitrificação de embriões bovinos produzidos após utilização de butirolactona I e de roscovitina durante a maturação *in vitro*”

Rosiára Rosária Dias Maziero^{a*}, Daniela Martins Paschoal^a, Carlos Renato de Freitas Guaitolini^a, André Maciel Crespilho^b, Carolina Nogueira de Moraes^a, Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga^a

^a Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil.

^b Universidade Santo Amaro, São Paulo, Brasil.

*Autor para correspondência:

Rosiára Rosária Dias Maziero

Endereço: Rubião Jr. s/n, CEP: 18618-970, Botucatu/SP, Brasil

Universidade Estadual Paulista, UNESP/FMVZ, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

Fone/Fax: +55 14 3880 2119

e-mail: rosiaramaziero@yahoo.com.br

RESUMO

Uma das técnicas mais usadas na maturação *in vitro* consiste na inibição ou no atraso da meiose nuclear oocitária, a qual permite uma transição mais regulada e apropriada da profase I para metafase II. Desta forma, este trabalho teve como objetivo produzir embriões bovinos *in vitro* pela adição dos fármacos inibidores da meiose oocitária roscovitina (ROS; Sigma-Aldrich, St. Louis) e butirolactona I (BL-I, Enzo Life Sciences International, Inc. 5120 Butler Pike Plymouth Meeting, PA 19462). Oócitos oriundos de abatedouro foram maturados em meio comercial (InVitro Brasil; Mogi Mirim, SP, Brasil) e mantidos em atmosfera de 5 % de CO₂. Para atrasar a meiose, os oócitos foram mantidos durante 6 horas em meio MIV na presença de ROS na concentração de 12,5 µM; de BL-I na concentração de 50 µM e na presença da associação dos fármacos na concentração de 6,25 µM de ROS e 25 µM de BL-I. Em seguida, os oócitos foram cultivados durante 18 horas em meio livre do agente para a retomada da meiose. Depois de 24 horas de maturação (dia 0), os oócitos foram inseminados em meio comercial de FIV (In Vitro Brasil), contendo heparina e PHE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina) sob as mesmas condições acima. O sêmen foi selecionado por gradiente de Percoll e a concentração foi ajustada para 2×10^6 espermatozoides/mL. Os prováveis zigotos foram cultivados em gotas de 90 µL de meio SOFaa (meio comercial In Vitro Brasil) numa atmosfera de 5% de CO₂, no dia 3 foi avaliada a taxa de clivagem e nos dias 6 e 7 avaliada a taxa de formação de blastocisto. Foram realizadas 20 rotinas (200 oócitos/rotina). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido pelo teste de Tukey utilizando o modelo linear geral (PROC GLM) do SAS 9.2. O nível de significância adotado foi de 5 %. A utilização de BL-I e de sua associação com a ROS elevou as taxas de clivagem e formação de blastocistos ($P < 0,05$). A ROS sozinha foi ineficiente, prejudicando o desenvolvimento embrionário,

com baixos índices de formação de blastocistos, em relação ao grupo controle e demais tratamentos ($P < 0,05$). Os embriões dos grupos BL-I e ROS + BL-I apresentaram maior número de células e menores índices de apoptose celular comparados aos demais grupos, tanto em embriões frescos como desvitrificados. Os embriões do grupo ROS + BL-I mostraram-se mais resistentes ao processo de vitrificação, com elevada taxa de reexpansão embrionária ($P < 0,05$). Assim, podemos concluir que o bloqueio da meiose utilizando BL-I ou sua associação a ROS mostrou-se eficaz no aumento da taxa de formação de blastocistos, e a associação de ROS + BL-I promoveu uma maior resistência ao processo de criopreservação embrionária.

Palavras-chave: Bovinos, Oócito, Inibidores maturação meiótica, Produção *in vitro*, Vitrificação.

1. Introdução

Muitos pesquisadores estudam metodologias mais eficientes para a criopreservação de oócitos e embriões. O sucesso da preservação e armazenamento destas estruturas é um dos avanços em programas de reprodução assistida, por favorecer a conservação de material genético e o excedente da produção embrionária. No entanto, a criopreservação dos embriões de mamíferos continua sendo um grande desafio, uma vez que as condições de cultivo alteram a constituição destas estruturas [1].

Um dos entraves para o pleno sucesso da produção *in vitro* de embriões são os eventos que ocorrem nos oócitos durante o período de maturação *in vitro*. A maturação dos oócitos é um processo longo, no qual as células adquirem capacidade intrínseca para desenvolvimento gradual, até alcançar a ativação do genoma embrionário [2]. Em humanos, a MIV é uma alternativa à estimulação ovariana, realizada no tratamento de infertilidade. No entanto, a qualidade e o potencial de desenvolvimento do embrião maturado, tem sido inferior àqueles maturados *in vivo*. Para tanto, exige-se uma sincronização entre a maturação nuclear e a citoplasmática [3].

Este processo complexo e distinto, envolve a maturação nuclear e citoplasmática, sendo a maturação nuclear uma segregação cromossômica e a citoplasmática uma reorganização de organelas, armazenamento de mRNA e transcrição de proteínas para que aconteçam a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial [2, 4].

O bloqueio da meiose antes da maturação tem sido sugerido como uma alternativa ao permitir que os oócitos tenham um tempo adicional no cultivo sem sofrer modificações, como a pré-maturação [5]. O bloqueio meiótico foi induzido por várias estratégias, incluindo o aumento no cAMP no oócito [6], pela síntese de proteínas ou pela inibição da fosforilação [7, 8, 9].

Assim, várias abordagens farmacológicas têm sido utilizadas para manter o bloqueio meiótico em oócitos bovinos. Os inibidores das quinases dependentes de ciclinas (CDK), tais como a butirolactona I (BL-I) [2, 10, 11, 12, 13] e a roscovitina (ROS) [4, 14, 15, 16, 17] têm sido utilizados para induzir o bloqueio meiótico. Estes inibidores de CDK inibem seletivamente a atividade do fator promotor de maturação (MPF), que está envolvida em vários eventos durante a maturação *in vitro* [10, 11] e *in vivo* [18, 19] de oócitos submetidos ao bloqueio meiótico.

Adicionalmente, após a inibição da maturação meiótica e produção *in vitro* de embriões, avitrificação tem sido considerada uma alternativa para a congelação, com resultados satisfatórios quando alguns fatores são considerados como a taxa de congelação e descongelação, viscosidade do meio ou coeficiente de transição para o estado vítreo e o volume de armazenamento [20].

Esta técnica pode ser utilizada rotineiramente tanto nos laboratórios de pesquisa como em fazendas, pois apresenta execução simples e é menos onerosa que a congelação por ser realizada na ausência do aparelho de congelação. Como esta técnica é realizada em curto espaço de tempo, não ocorre formação de cristais de gelos intracelulares, os quais são os principais causadores das crioinjúrias embrionárias [21].

Com base nessas informações, este trabalho teve como objetivo avaliar a taxa de sobrevivência embrionária pós-vitrificação de oócitos submetidos à inibição meiótica durante a maturação *in vitro*, com roscovitina (ROS) e butirolactona I (BL-I).

2. Material e Métodos

Todas as substâncias utilizadas neste trabalho foram adquiridas da Sigma (Sigma-Aldrich[®], Corporation, St. Louis, MO), exceto para aquelas que são especificadas no texto.

2.1 Coleta dos ovários, punção folicular e maturação *in vitro* (MIV)

Para o experimento foram utilizados ovários de abatedouro comercial e estes transportados ao laboratório de FIV do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Botucatu (20 réplicas/50 oócitos/tratamento). No laboratório, os ovários foram lavados com NaCl a 0,9 % na temperatura de 38 °C. Todos os folículos com diâmetro entre 2-8 mm foram aspirados com seringas de 10 mL e agulhas 40 x 12 mm.

Após a seleção, os oócitos foram lavados em meio HEPES (Gibco®) e transferidos para gotas de meio de maturação *in vitro* (MIV – In Vitro Brasil). Os oócitos permaneceram em estufa com 5 % de CO₂ em ar, temperatura de 38,5°C e umidade absoluta.

Os oócitos foram divididos nos diferentes grupos submetidos à inibição da maturação nuclear, sendo eles:

- Grupo Controle
- Grupo Roscovitina (ROS)
- Grupo Butirolactona-I (BL-I)
- Grupo associação da Roscovitina + Butirolactona I (ROS + BL-I)

2.2 Inibição meiótica

2.2.1 Roscovitina (Roscovitine R7772 Sigma ≥98)

Para bloquear a meiose, a roscovitina (ROS) foi adicionada ao meio de maturação na concentração de 12,5 µM por 6 horas e o tempo para reversão da meiose (meio MIV livre de ROS) foi de 18 horas.

2.2.2 Butirolactona I (BML-CC210-1000)

A butirolactona I (BL-I, Enzo Life Sciences International, Inc. 5120 Butler Pike Plymouth Meeting, PA 19462) foi adicionada ao meio de maturação na concentração de 50 μ M. O tempo de bloqueio meiótico de 6 horas e da reversão da meiose (meio de MIV livre de BL-I) foi de 18 horas.

2.2.3 Roscovitina + Butirolactona-I

A associação de ROS (ROS 6,25 μ M) e BL-I (BL-I 25 μ M) também foi realizada. O tempo de inibição da meiose foi de 6 horas e o tempo de reversão (meio MIV livre de ROS e BL-I) foi de 18 horas.

2.3. Fertilização *in vitro*

Oócitos maturados de todos os grupos foram fertilizados *in vitro* com sêmen congelado de touro da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). O sêmen foi selecionado por gradiente Percoll (Nutricell) nas concentrações de 45 % e 90 %. A concentração final foi ajustada para 2×10^6 espermatozóides/mL. Os oócitos foram incubados em meio de FIV (In Vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, Brasil) durante 18 horas, em estufa com 5 % de CO₂ em ar, a temperatura de 38,5 °C e umidade absoluta.

2.4. Cultivo *in vitro* e vitrificação

Os prováveis zigotos foram cultivados em meio SOFaa (In Vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, Brasil). Os embriões foram mantidos em estufa com 5 % de CO₂, a temperatura de 38,5 °C e umidade absoluta. No dia três (D3) foi verificada a taxa de clivagem e nos dias seis (D6) e sete (D7) foram avaliadas as taxas de formação de blastocisto. Após verificar a taxa, os embriões foram vitrificados.

A vitrificação dos embriões foi realizada nos dias D6 e D7 de cultivo (10 réplicas) conforme o protocolo de Campos-Chillòn et al. [22], com algumas modificações. Embriões produzidos *in vitro* foram expostos a solução de vitrificação 1, composta por 5 M de EG em meio base durante 3 minutos e transferidos para uma gota de 15 µL da solução de vitrificação 2, composta por 7M de EG, 0.5M de galactose e 18% (w/v) de ficoll 70 em meio base. Em seguida, foram envasados em palhetas francesas estéreis de 0,25 mL (Nutricell), as quais foram montadas da seguinte maneira: 1 cm de galactose (0.5 M em meio base), 0,5 cm de ar, 7 cm de galactose seguido de mais 0,5 cm de ar. Os embriões contidos na SV2 foram transferidos às palhetas (gota de 15 µL de SV2) seguidos de 0,5 cm de ar e completando-se com galactose até a extremidade da palheta.

Para o aquecimento, as palhetas foram mantidas em ar por 8 segundos e depois em água a 37°C por 15 segundos. Os embriões foram então lavados e cultivados em meio SOFaa contendo 10 % de SFB durante 12 horas em estufa de 5 % de CO₂ para a avaliação da reexpansão embrionária.

2.5. Avaliação do índice de apoptose

Foi avaliado o índice de apoptose após 7 dias de CIV (D0 = FIV). Foram utilizados de 10 a 15 embriões de cada grupo experimental pela técnica TUNEL[®] (Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End Labeling) que identifica *in situ*, a fragmentação internucleossômica do DNA, evento este resultante da apoptose. Esta avaliação foi realizada com o “*Kit in Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein*” (Roche[®] - 11 684 795 910, Mannheim, Alemanha).

Os embriões foram lavados em solução de lavagem (0,1 % PVP/PBS) e fixados em solução fixadora (paraformaldeído a 4 %) por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente foram permeabilizados em solução permeabilizadora (0,1 % de triton X-

100 e 0,1 % citrato de sódio em PBS) por 1 hora em câmara úmida e temperatura ambiente. Os embriões foram incubados no controle positivo e negativo com a solução de DNAase (Promega, M 6101, Madison, EUA) por 1 hora à 37 °C (estufa) no escuro.

Após, o controle positivo e as amostras foram incubadas em gotas de 10 µL do MIX TUNEL em lâminas com coroa de esmalte por 1 hora a temperatura de 37°C no escuro e em câmara úmida. O controle negativo foi incubado apenas com solução marcadora na ausência da solução enzimática para conferir a marcação.

Após serem lavados em solução de lavagem, controles e amostras foram submetidos a um contraste para visualização do DNA com solução de Hoechst 33342 (1 mg/mL) e glicerol em uma lâmina com lamínula e foram analisados em microscópio de fluorescência invertido. Com filtro de excitação de 450-490 nm e de emissão de 515 nm os núcleos fluorescentes em verde (isotiocianato de fluoresceína - FITC) foram considerados as células TUNEL positivas, ou seja, apresentaram o DNA fragmentado. Com filtro de excitação de 365 nm e de emissão de 420 nm os núcleos fluorescentes em azul (Hoechst 33342) indicaram a presença e a localização do núcleo das células.

Para a contagem do número de células apoptóticas (coradas em verde) e número total de células (coloração azul) foi utilizado o programa Image J 1.41 (Wayne Rasband National Institutes of Health, Bethesda, EUA). Com base nestes dados, foi feito o cálculo da porcentagem de ocorrência da apoptose (número de células apoptóticas em relação ao número total de células do embrião).

2.6. Análise Estatística

Para análise estatística os dados foram analisados utilizando a ANOVA pelo PROC GLM do SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Fontes de variação no modelo incluindo tratamento e réplica foram considerados como efeito fixo e aleatório,

respectivamente. Os dados são apresentados como média e desvio padrão. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 5 %.

3. Resultados

A taxa de clivagem modificou-se com o uso das drogas inibidoras da meiose. Observamos que os grupos tratados com BL-I e com a sua associação (ROS + BL-I) apresentaram uma maior taxa de clivagem em relação ao grupo controle (BL-I = 95,58 %; ROS + BL-I = 96,44 %; C = 86,83 % - Tabela 1).

Quando utilizamos a ROS, a taxa de clivagem foi similar ao grupo controle (ROS = 89,73 % - Tabela 1) e inferior aos grupos tratados com BL-I e com a sua associação (ROS + BL-I).

Tabela 1. Média (%) dos diferentes fármacos inibidores da meiose: a ROS, a BL-I e a associação ROS + BL-I sobre a porcentagem de clivagem/oócitos no dia três (D3) de desenvolvimento embrionário.

Tratamento	Número de Oócitos	Taxa de Clivagem (%)
Controle	486	86,83 ^a
ROS	419	89,73 ^a
BL-I	498	95,58 ^b
ROS + BL-I	478	96,44 ^b

^{ab}Médias com sobrescritos incomuns, na mesma coluna, diferem (P < 0,05).

Controle: blastocistos controle maturados com 24 horas; **ROS:** blastocistos bloqueados na maturação com roscovitina 12,5 µM por 6 horas com reversão do bloqueio por 18 horas; **BL-I:** blastocistos bloqueados na maturação com butirolactona-I 50 µM por 6 horas com reversão do bloqueio por 18 horas; **ROS + BL-I:** blastocistos bloqueados na maturação com roscovitina 6,25 µM + butirolactona-I 25 µM por 6 horas com reversão do bloqueio por 18 horas.

Ao avaliarmos as taxas de formação de blastocistos no dia seis (D6 – Tabela 2) observamos diferença estatística entre os grupos. Verificamos que ocorreu uma melhora na produção de embriões nos grupos em que foram utilizados BL-I (56,77 %) ou ROS + BL-I (57,32 %), tanto em relação ao grupo controle (43,27 %) como em relação ao grupo ROS (39,16 %).

O grupo em que foi utilizada a ROS verificamos uma piora na taxa de produção embrionária (D6 – Tabela 2). Este fármaco prejudicou o desenvolvimento embrionário, visto que sua produção foi inferior ao grupo controle (livre de fármaco).

Tabela 2. Taxa de formação de blastocistos (%) avaliados no **dia 6** (D6) com inibição meiótica por 6 horas e reversão da meiose por 18 horas.

GRUPOS	N de Blastocistos por Estágio de Desenvolvimento					Total de oócitos	%
	Bi	B1	Bx	Bn	Be		
C 24 h	39	77	93	1	0	480	43,27 ^a
ROS	23	66	82	0	0	419	39,16 ^c
BL-I	24	142	123	0	0	497	56,77 ^b
ROS + BL-I	11	128	136	0	0	478	57,32 ^b

^{ab}Médias com sobrescritos incomuns, na mesma coluna, diferem ($P < 0,05$).

Controle: blastocistos controle maturados com 24 horas; **ROS:** blastocistos bloqueados na maturação com roscovitina 12,5 μ M por 6 horas com reversão do bloqueio por 18 horas; **BL-I:** blastocistos bloqueados na maturação com butirolactona-I 50 μ M por 6 horas com reversão do bloqueio por 18 horas; **ROS + BL-I:** blastocistos bloqueados na maturação com roscovitina 6,25 μ M + butirolactona-I 25 μ M por 6 horas com reversão do bloqueio por 18 horas.

Na tabela 3 apresentamos os dados de formação de blastocistos no dia sete (D7). Observamos que os grupos tratados com BL-I (58,86%) e ROS + BL-I (55,96%) apresentaram uma maior produção embrionária em comparação ao grupo controle (42,64%). Novamente, como apresentado na tabela 2 (taxa de formação de blastocistos no dia 6 – D6), a utilização de ROS (41,43 %) durante a MIV interferiu de forma negativa na taxa de formação de blastocistos no dia 7 (Tabela 3 – D7), com valor inferior ao grupo controle (42,64 %).

Tabela 3. Taxa de formação de blastocistos (%) avaliados no **dia 7** (D7) com inibição meiótica por 6 horas e reversão da meiose por 18 horas.

GRUPOS	N de Blastocistos por Estágio de Desenvolvimento					Total de oócitos	%
	Bi	Bl	Bx	Bn	Be		
C 24 h	3	58	86	11	9	405	42,64 ^a
ROS	7	50	78	9	7	359	41,43 ^c
BL-I	0	71	155	8	10	423	58,86 ^b
BL-I + ROS	0	78	130	10	4	386	55,96 ^b

^{ab}Médias com sobrescritos incomuns, na mesma coluna, diferem ($P < 0,05$).

Controle: blastocistos controle maturados com 24 horas; **ROS:** blastocistos bloqueados na maturação com roscovitina 12,5 μ M por 6 horas com reversão do bloqueio por 18 horas; **BL-I:** blastocistos bloqueados na maturação com butirolactona-I 50 μ M por 6 horas com reversão do bloqueio por 18 horas; **ROS + BL-I:** blastocistos bloqueados na maturação com roscovitina 6,25 μ M + butirolactona-I 25 μ M por 6 horas com reversão do bloqueio por 18 horas.

Foi observada diferença estatística no número de células apoptóticas dos embriões frescos entre os grupos tratados ($P < 0,05$). Os grupos controle e ROS

apresentaram maior taxa de células em apoptose em relação aos grupos BL-I e ROS + BL-I. Adicionalmente, os grupos controle e ROS apresentaram um menor número de células (Tabela 4).

Tabela 4. Média (desvio padrão) do número total de células e de células apoptóticas dos blastocistos bovinos frescos.

GRUPOS	Embriões frescos	
	n total de células	% células lesionadas
Controle	108,2 ± 10,7 ^a	16,6 ± 4,5 ^a
ROS 12,5	109,7 ± 8,5 ^a	14,2 ± 6,4 ^a
BL 50	150,7 ± 11,4 ^b	7 ± 3,1 ^b
ROS + BL-I	161,3 ± 12,8 ^b	6,6 ± 4,4 ^b

^{ab}Médias com sobrescritos incomuns, na mesma coluna, diferem (P < 0,05).

Controle: blastocistos controle maturados com 24 horas; **BL-I:** blastocistos bloqueados na maturação com butirrolactona-I 50 µM por 6 horas com reversão do bloqueio por 18 horas; **ROS:** blastocistos bloqueados na maturação com roscovitina 12,5 µM por 6 horas com reversão do bloqueio por 18 horas; **ROS + BL-I:** blastocistos bloqueados na maturação com roscovitina 6,25 µM + butirrolactona-I 12,5 µM por 6 horas com reversão do bloqueio por 18 horas.

Com relação ao processo de criopreservação embrionária, foi observada diferença entre os grupos. O grupo tratado com BL-I + ROS apresentou uma maior taxa de reexpansão após o processo de criopreservação (Tabela 5).

Observou-se também diferença estatística no número de células apoptóticas dos embriões desvitrificados entre os grupos estudados (P < 0,05). Os grupos controle e ROS apresentaram maior taxa de células apoptóticas em relação aos grupos BL-I e BL-I + ROS. Os embriões produzidos nos grupos controle e ROS apresentaram um menor número de células (Tabela 5).

Tabela 5. Número total de células e células apoptóticas dos blastocistos bovinos aquecidos, número total de embriões vitrificados e da porcentagem de reexpansão embrionária.

GRUPOS	Embriões aquecidos			
	n embriões vitrificados	n total de células	% células lesionadas	% reexpansão
Controle	163	94,3 ± 9,4 ^a	21,2 ± 8,1 ^a	74,66 ± 6,2 ^a
ROS	176	99,9 ± 8,7 ^a	28,1 ± 9,6 ^a	73,23 ± 6,1 ^a
BL-I	172	108 ± 7,7 ^b	15,5 ± 5,5 ^b	76,04 ± 7,0 ^a
ROS + BL-I	182	107,5 ± 8,0 ^b	15,7 ± 5,8 ^b	93,40 ± 8,8 ^b

Controle: blastocistos controle maturados com 24 horas; **BL-I:** blastocistos bloqueados na maturação com butirrolactona-I 50 µM por 6 horas com reversão do bloqueio por 18 horas; **ROS:** blastocistos bloqueados na maturação com roscovitina 12,5 µM por 6 horas com reversão do bloqueio por 18 horas; **ROS + BL-I:** blastocistos bloqueados na maturação com roscovitina 6,25 µM + butirrolactona-I 12,5 µM por 6 horas com reversão do bloqueio por 18 horas.

4. Discussão

Diversos estudos confirmam que a qualidade dos oócitos determina a taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Considerando que o ambiente de cultivo tem grande impacto sobre a qualidade dos blastocistos, as evidências indicam que as condições de maturação *in vitro* influenciam diretamente na qualidade dos embriões produzidos [20]. Desta forma, verificamos que a adição de fármacos inibidores da meiose ROS e BL-I interferiram na taxa de produção de embriões *in vitro* em oócitos bovinos.

Em 2012, Bilodeau-Goeseels [23] publicou um artigo no qual revisou a utilização de fármacos inibidores da meiose oocitária. Esta revisão relata que estes inibidores foram utilizados de forma intensa na década passada, porém, nos últimos anos, estes estudos decaíram. O motivo para tal estaria na não eficiência dos inibidores na melhora dos índices de formação de blastocistos, o que teria desencorajado os pesquisadores em continuarem nesta linha de pesquisa.

O presente experimento vai ao encontro as afirmativas de Bilodeau-Goeseels [23] e teve como propósito produzir embriões *in vitro* com melhor qualidade, após inibição da meiose oocitária utilizando ROS e BL-I por um tempo e concentrações menores e, além disso, vitrificar estes embriões produzidos e avaliar a taxa de reexpansão embrionária.

Neste estudo obtiveram-se elevadas taxas de produção de embriões ao utilizar BL-I (50 μM ; D6= 56,77 %; D7= 58,86 %) e sua associação a ROS (BL-I 25 μM + ROS 6,25 μM ; D6= 57,32 %; D7= 55,96 %), por um tempo de inibição meiótica de 6 horas e reversão por 18 horas (meio MIV livre de fármacos). Em contrapartida, quando utilizamos ROS verificamos uma queda na taxa de formação de blastocistos, tanto no D6 como no D7 (12,5 μM ; D6= 39,16 %; D7= 41,43 %), até mesmo em relação ao grupo controle (D6= 43,27 %; D7= 42,64 %).

De acordo com a revisão bibliográfica, apenas Hashimoto et al. [11] observaram melhores taxas de produção de embriões *in vitro* utilizando BL-I na concentração de 100 μM por 15,5 horas ou 21 horas. Estes autores obtiveram 40 e 42 % de blastocistos (D7), com 15,5 e 21 horas de inibição, respectivamente. No D8, estes autores encontraram 49 % de blastocistos, com 15,5 horas de inibição utilizando BL-I e 33 % utilizando BL-I por 21 horas. A redução do tempo e concentração dos fármacos talvez seja uma das alternativas para a utilização dos inibidores da meiose oocitária.

Diferentemente dos dados obtidos pelo nosso estudo, Adona et al. [13] quando testaram uma concentração de BL-I a 100 μM e a associação de BL-I (6,25 μM) + ROS (12 μM) por 24 horas de inibição, não observaram diferença nas taxas de clivagem entre os grupos. No nosso estudo, os grupos BL-I e ROS + BL-I apresentaram taxas de clivagem superiores ao grupo controle e o grupo tratado com ROS. Igualmente ao estudo de Adona et al. [13], o grupo tratado com a ROS apresentou dados similares de clivagem em relação ao grupo controle. Apesar dessas diferenças entre os dados obtidos, não podemos compará-los uma vez que existem diferenças metodológicas entre eles, principalmente nas concentrações e tempo de inibição da meiose oocitária.

Até o momento, nenhum trabalho utilizou o tempo de inibição da meiose por 6 com reversão da inibição por 18 horas em oócitos bovinos, conforme utilizado neste experimento. Neste caso, a utilização dos fármacos mostrou-se totalmente reversível e capaz de produzir embriões com taxas superiores ao grupo controle (BL-I e ROS + BL-I - Tabelas 2 e 3).

A ROS não se mostrou eficiente em melhorar as taxas de produção de embriões da forma em que foi utilizada neste experimento (12,5 μM /6 horas) apresentando índices inferiores ao grupo controle. Outros autores relataram também um prejuízo nas taxas de produção de embriões com o uso da ROS (25 μM /24 horas). Adona e Leal (2004) obtiveram 35 % de blastocistos (D8) no controle, enquanto que o grupo tratado com ROS obteve-se 24,2 % de blastocistos.

Em contrapartida, trabalhos mostram que a ROS foi eficiente na produção *in vitro* de embriões bovinos, sem alteração da competência oocitária. Barreto et al.[24] relataram taxas de produção de embriões similares entre o grupo controle (29,6 \pm 6,6 %) e aqueles em que foi utilizada ROS na concentração de 25 μM por diferentes

momentos: 16, 20 e 24 horas na MIV ($35,2 \pm 6,8 \%$, $31,7 \pm 2,0 \%$ e $33 \pm 4,7 \%$, respectivamente).

Mermillod et al. [14] apresentaram dados similares nas taxas de produção de embriões entre oócitos do grupo controle e tratado com ROS na concentração de $25 \mu\text{M}$ por 24 horas, durante a MIV. Estes autores encontraram taxa de formação de blastocisto de $23 \pm 6 \%$ para o grupo controle (D7) e de $18 \pm 5 \%$ para o grupo tratado com ROS. Outros estudos também relatam similaridade na produção de embriões utilizando ROS ($25 \mu\text{M}/24$ horas). Lagutina et al. [15] encontraram $37,2 \%$ de blastocistos (D7) no grupo controle e $48,5 \%$ no grupo tratado. Albarracín et al. [25] verificaram também similaridade entre grupo controle e tratado com ROS ($50 \mu\text{M}$) nas taxas de clivagem e formação de blastocistos. Entretanto, no presente estudo, não podemos fazer uma comparação direta entre artigos, visto que as doses e tempo de inibição utilizando ROS foram diferentes aos já relatados na literatura.

A utilização de BL-I na concentração de $50 \mu\text{M}$ por 6 horas resultou em uma taxa de produção embrionária ($56,77 \%$ de Bls – D6; $58,86 \%$ de Bls – D7) superior ao grupo controle ($42,64 \%$ – D6; $43,27 \%$ – D7). Estes dados divergem aos relatados por outros autores em que a utilização de BL-I acarretou a mesma taxa de produção embrionária do grupo livre de fármaco [5, 10, 12, 13].

Adona et al. [13] obtiveram $31,3 \%$ de blastocistos (D7) no grupo tratado com BL-I e $36,5 \%$ de blastocistos (D7) no grupo controle, utilizando $100 \mu\text{M}$ de BL-I por 24 horas. Da mesma forma, Lonergan et al. [5] relataram taxas de blastocistos similares, entre grupo controle e tratado com BL-I sendo, $28,4 \%$ de blastocistos (D8) no grupo controle e 27% no grupo tratado com $100 \mu\text{M}$ de BL-I por 24 horas. Estes dados divergem aos obtidos no presente estudo, visto que a taxa de formação de blastocistos foi bem superior ao grupo controle (Tabelas 2 e 3).

As taxas de embriões obtidas com a associação dos fármacos a MIV foram superiores ao grupo controle, sendo de 57,32 % no dia 6 e 55,96 % no dia 7. Estes dados mostram que a utilização destas drogas associadas favoreceu o desenvolvimento embrionário.

Adona et al. [13] observaram dados similares entre o grupo controle e o tratado, quando utilizou BL-I + ROS no meio de MIV durante 24 horas. Demais autores, relatam também similaridade entre os grupos tratados e controle [4]. Porém, no presente estudo, quando esta associação foi realizada verificamos um aumento na produção embrionária. A associação dos fármacos foi superior ao grupo controle e ao grupo tratado com ROS. Além disso, esta associação favoreceu o processo de reexpansão embrionária pós-vitrificação.

No presente experimento observamos diferenças no número de células íntegras dos embriões em comparação com a literatura. Plourde et al. [26] relatam que, comparando dois laboratórios de PIV (A e B), os embriões do laboratório A apresentaram em média 111 ± 23 de células embrionárias e os embriões do laboratório B 115 ± 25 . Os embriões do grupo controle e do grupo ROS apresentaram dados similares aos obtidos por estes autores, sendo de 108,2 para o grupo controle e 109,7 para o grupo ROS. Em contrapartida, os grupos BL-I (150,7) e ROS + BL-I (161,3) apresentaram altos número de células embrionárias. Lonergan et al. [5], Mermillod et al. [14], Imai et al. [27], e Adona et al. [13] não observaram diferenças no total de células íntegras entre seus grupos, quando utilizaram ROS ou BL-I, respectivamente para inibir a meiose oocitária.

Além do total de células embrionárias, o total de células apoptóticas diferiu entre os tratamentos (Tabela 4). A melhor forma para se avaliar a qualidade embrionária é pelo índice de apoptose celular, sendo que a alta incidência desta está associada com a

redução da viabilidade embrionária [28]. Verificamos que o grupo controle e o grupo ROS, apresentaram mais células apoptóticas em relação aos grupos BL-I e ROS + BL-I. Estes dados divergem de outros autores, os quais obtiveram similaridade no total de células apoptóticas entre o grupo controle e os tratados com inibidores [5, 13, 14, 26].

Após a vitrificação e aquecimento dos embriões PIV foram encontradas diferenças na reexpansão embrionária entre os grupos estudados. O grupo ROS + BL-I apresentou elevada taxa de reexpansão (93,10 %) quando comparado aos demais grupos que se apresentaram de forma similar (C= 74,66 %; ROS= 73,23 %; BL-I= 76,04 % - Tabela 5). A taxa de reexpansão do grupo ROS + BL-I foi superior às encontradas na literatura, porém nos demais grupos, as taxas são similares as já relatadas [21, 29]. Estes dados indicam que os fármacos não prejudicaram os embriões após o processo de vitrificação, o que diverge de todos os artigos já publicados. Além disso, poucos trabalhos vitrificaram embriões após inibição meiótica, apenas Ponderato et al. [4] relatam ter criopreservado embriões após utilização de ROS + BL-I (12,5 μ M ROS + 6,25 μ M BL-I) por 24 horas e obtiveram dados similares entre o grupo controle e o tratado.

Cuello et al. [30] quando compararam embriões frescos com embriões vitrificados e aquecidos, observaram uma similaridade no número total de células, entretanto Dhali et al. [31] obtiveram um maior número de células em embriões frescos quando comparados aos vitrificados (157 x 130, respectivamente). Estes dados divergem dos obtidos no presente experimento, onde todos os grupos de embriões frescos possuíram um maior número de células íntegras que os grupos de embriões vitrificados (Tabela 5).

Após a vitrificação ocorreu uma diminuição no número de células, isto se deve as crioinjúrias sofridas, além do mais, os meios de vitrificação contém altas

concentrações de crioprotetores que são altamente tóxicos, causando um desarranjo no citoesqueleto e no citoplasma celular e conseqüentemente no embrião como um todo.

A vitrificação é considerada potente causadora de danos físicos, químicos e térmicos os quais podem aumentar a apoptose em blastocisto [32]. A criotolerância e a taxa de apoptose são indicadores de qualidades de embriões PIV [33, 34]. A queda da viabilidade embrionária após os processos de vitrificação e aquecimento ocorrem principalmente devido aos danos tóxicos dos crioprotetores que invadem a célula durante os processos de congelamento [29].

Nesse trabalho foi possível observar aumento da apoptose após a vitrificação e aquecimento, quando se comparou embriões frescos com embriões aquecidos. Sudano et al. [35] também obtiveram um alto índice de apoptose em embriões que foram vitrificados (49,4%) em relação aos frescos (20,8 %). Esses resultados também estão de acordo com outros autores na literatura [28, 36].

Dhali et al. [31], encontraram em seu experimento uma maior taxa de células em apoptose nos embriões que foram submetidos à vitrificação, entretanto num índice bem mais baixo que neste trabalho: 0,11 % para os vitrificados e 0,08 % para os frescos. Estes autores vitrificaram apenas mórulas e em poucas réplicas (3), o que diverge do presente experimento, onde foram utilizados B1 (blastocistos) e Bx (blastocistos expandidos) em dez réplicas.

Após mensurações do índice de apoptose, foi observado que antes e após a vitrificação todos os grupos sofreram apoptose ocorrendo um comportamento similar entre os grupos Controle e ROS e entre os grupos BL-I e ROS + BL-I.

A comparação entre embriões frescos e vitrificados nos mostrou que a taxa de células em apoptose elevou de forma considerável entre os grupos experimentais, comprovando o efeito deletério da vitrificação em embriões PIV, os quais são mais

sensíveis que embriões produzidos *in vivo* frente à criopreservação, e que muitas vezes pode estar relacionado ao seu alto conteúdo lipídico provocado pelas condições de cultivo.

5. Conclusões

O presente experimento nos mostrou que a butirolactona I e sua associação a roscovitina favoreceu a produção *in vitro* de embriões bovinos, elevando os índices de formação de blastocistos. Adicionalmente, verificamos que a associação destes fármacos provocou uma maior resistência ao processo de vitrificação pela elevada taxa de reexpansão pós-criopreservação. Os embriões pós-vitrificação apresentaram elevadas taxas de células apoptóticas, confirmando a hipótese de que os embriões produzidos *in vitro* são mais sensíveis a este processo comparado a embriões produzidos *in vivo*.

Os resultados obtidos reforçam a hipótese inicial, de que o bloqueio meiótico seria uma vantagem na melhoria da qualidade embrionária, o protocolo utilizado por 6 horas de inibição, facilita o manejo dos oócitos para o uso em programas comerciais de produção de embriões *in vitro*, permite a obtenção de um alto índice de produção embrionária e leva a produção de embriões de melhor qualidade, mais resistentes a criopreservação.

6. Referências

[1] Diez C, Duque P, Gomez H, Hidalgo CO, Tamargo C, Rodriguez A, Fernandez L, de la Varga S, Fernandez A, Facal N, Carbajo M. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. *Theriogenology* 2005; 64:317-33.

- [2] Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 2009; 71:836-48.
- [3] Shu YM, Zeng HT, Ren ZI, Zhuang GGL, Liang XY, Shen HW, Yao SZ, Ke PQ, Wang NN. Effects of cilostamide and forskolin on the meiotic resumption and embryonic development of immature human oocytes. *Hum Reprod* 2008; 23: 504-13.
- [4] Ponderato N, Lagutina I, Crotti G, Turini P, Galli C, Lazzari G. Bovine oocytes treated prior to *in vitro* maturation with a combination of butyrolactone I and roscovitine at low doses maintain a normal developmental capacity. *Mol Reprod Dev* 2001; 60: 579-85.
- [5] Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Yang X, Boland M. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. *Mol Reprod Dev* 2000; 57: 204-9.
- [6] Sirard MA, Richard F, Mayes M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology* 1998; 49: 483-97.
- [7] Sirard MA, Coenen K. Meiotic resumption is prevented by mousine in bovine immature oocytes. *Theriogenology* 1994;47: 201.
- [8] Lonergan P, Khatir H, Carolan C, Mermillod P. Bovine blastocyst production *in vitro* after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. *J Reprod Fertil* 1997; 109: 355-65.
- [9] Avery B, Faerge I, Holm P. Confocal microscopy of bovine oocytes and roscovitine treated oocytes with emphasis on mitochondria distribution and nuclear stage. *Theriogenology* 2002; 57: 711.

- [10] Kubelka M, Motlík J, Schultz RM, Pavlok A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. *Biol Reprod* 2000; 62: 292-302.
- [11] Hashimoto S, Minami N, Takaura R, Imai H. Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest *in vitro*. *Biol Reprod* 2002; 66: 1696-701.
- [12] Adona PR, Leal CLV. Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. *Zygote* 2004; 12: 197-4.
- [13] Adona PR, Pires, PRL, Quetglas MD, Schwarz KRL, Leal CLV. Nuclear maturation kinetics and *in vitro* embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitina. *Anim Reprod Sci* 2008; 104: 389-97.
- [14] Mermillod P, Tomanek M, Marchal R, Meijer L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF Kinase Activity. *Mol Reprod Dev* 2000; 55: 89-95.
- [15] Lagutina I, Ponderato N, Lazzari G, Galli C. Kinetics of oocyte maturation and subsequent development of ivf, parthenogenetic, and nt bovine embryos after meiotic inhibition with roscovitina. *Cloning Stem Cells* 2002; 4: 113-9.
- [16] Lonergan P, Faerge I, Hyttel PM, Boland M, Fair T. Ultrastructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest *in vitro* using roscovitine or butyrolactone. *Mol Reprod Dev* 2003; 64: 369-78.
- [17] Jimenez Macedo AR, Izquierdo D, Urdaneta A, Anguita B, Paramio MT. Effect of roscovitine on nuclear maturation, MPF and MAP kinase activity and embryo development of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 2006;65: 1769-82.

- [18] Ponderato N, Crotti G, Turini P, Duchi R, Galli C, Lazzari G. Embryonic and foetal development of bovine oocytes treated with a combination of butyrolactone I and roscovitine in an enriched medium prior to IVM and IVF. *Mol Reprod Dev* 2002; 62: 513-8.
- [19] Coy P, Romar R, Payton RR, McCann L, Saxton AM, Edwards JL. Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the S-enantiomer of roscovitine, effects on maturation, fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Reproduction* 2005a; 129: 19-26.
- [20] Arav A. Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology* 2014; 81: 96-102.
- [21] Paschoal DM, Sudano MJ, Guastali MD, Maziero RRD, Crocomo LF, Magalhães LCO, Rascado TS, Martins Jr A, Landim-Alvarenga FC. Forskolin effect on the cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. *Zygote* 2012; 18: 1-12.
- [22] Campos-Chillòn LF, Walker DJ, Torre-Sanchez JF, Seidel Jr. GE. *In vitro* assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. *Theriogenology* 2006; 65: 1200-14.
- [23] Bilodeau-Goeseels S. Bovine oocyte meiotic inhibition before *in vitro* maturation and its value to *in vitro* embryo production: does it improve developmental competence? *Reprod Dom Anim* 2012; 47: 687-93.
- [24] Barreto LSS, Caiado Castro VS, Garcia JM, Mingoti GZ. Meiotic inhibition of bovine oocytes in medium supplemented with a serum replacer and hormones: effects on meiosis progression and developmental capacity. *Zygote* 2011; 19: 107-16.

- [25] Albarracín JL, Morató R, Izquierdo D, Mogas T. Effects of roscovitine on the nuclear and cytoskeletal components of calf oocytes and their subsequent development. *Theriogenology* 2005; 64, 1740-55.
- [26] Plourde D, Vigneault C, Laflamme I, Blondin P, Robert C. Cellular and molecular characterization of the impact of laboratory setup on bovine *in vitro* embryo production. *Theriogenology* 2012; 77: 1767-78.
- [27] Imai K, Kobayashi S, Kaneyama K, Kojima T, Nagai T. Effects of butyrolactone-I on GVBD in bovine oocytes and subsequent maturation, fertilization and development *in vitro*. *J Reprod Devel* 2002; 48: 249-55.
- [28] Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J Reprod Fertil* 1999; 117: 97-105.
- [29] Park SY, Kim, EY, Cui XS, Tae JC, Lee WD, Kim NH, Park SE, Lim JH. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. *Zygote* 2006; 14: 125-31.
- [30] Cuello C, Gomis J, Alminana C, Maside C, Sanchez-Osorio J, Gil MA, Sánchez A, Parrilla J, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA. Effect of MEM vitamins and forskolin on embryo development and vitrification tolerance of *in vitro*-produced pig embryos. *Anim Reprod Sci* 2013; 136: 296-302.
- [31] Dhali A, Anchamparathy VM, Butler SP, Mullarky IK, Pear-Son RE, Gwazdauskas FC. Development and quality of bovine embryos produced *in vitro* using growth factor supplemented serum-free system. *Open J Anim Sci* 2011; 1:97-105.
- [32] Sudano MJ, Paschoal DM, Rascado TS, Magalhães LCO, Crocomo L, Lima-Neto JF, Landim-Alvarenga FC. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology* 2011; 5: 1211-20.

- [33] George F, Daniaux C, Genicot G, Verhaeghe B, Lambert P, Donnay I. Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: embryo development and quality before and after transient transfer. *Theriogenology* 2008; 69: 612-23.
- [34] Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, Fuente J, Boland MP, Lonergan P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implication for blastocysts development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod.* 2003; 68: 236-43.
- [35] Sudano MJ, Santos VG, Tata A, Ferreira CR, Paschoal DM, Machado R, Buratini Jr J, Eberlin MN, Landim-Alvarenga FC. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* *in vitro*- and *in vivo*-produced blastocysts. *Biol Reprod* 2012; 87: 1-11.
- [36] Márquez-Alvarado YC, Galina CS, Castilla B, León H, Moreno-Mendoza N. Evidence of damage in cryopreserved and fresh bovine embryos using the Tunel technique. *Reprod. Dom Anim* 2004; 39: 141-5.

Capítulo 4

Trabalho a ser enviado

“Efeito da adição de fármacos inibidores da meiose oocitária na atividade do fator promotor de maturação e na organização das organelas citoplasmáticas”

Rosiára Rosária Dias Maziero^{1*}, Carlos Renato de Freitas Guaitolini¹, Daniela Martins Paschoal¹, André Maciel Crespilho², Midyan Daroz Guastali¹, Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga¹

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil;

² Universidade de Santo Amaro, São Paulo, Brasil.

*Autor para correspondência:

Rosiára Rosária Dias Maziero

Endereço: Rubião Jr. s/n, CEP: 18618-970, Botucatu/SP, Brasil

Universidade Estadual Paulista, UNESP/FMVZ, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

Fone/Fax: +55 14 3880 2119

e-mail: rosiaramaziero@yahoo.com.br

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do bloqueio meiótico de oócitos bovinos com os inibidores de CDK roscovitina e butirolactona I sobre a maturação nuclear, expressão das proteínas ERK 1 e 2, ciclina B1 e proteína p34^{cdc2}, localização das proteínas ERK 1 e 2, ciclina B1 e proteína p34^{cdc2} bem como avaliar as alterações ultraestruturais provocadas pela utilização destes fármacos. Oócitos imaturos obtidos de vacas de abatedouro foram divididos nos seguintes grupos: (1) controle: oócitos submetidos apenas à MIV em TCM199 por 24 h, (2) oócitos tratados com ROS 12,5 µM, (3) BL-I 50 µM, (4) ROS (6,25 µM) + BL-I (25 µM), durante 6 h e depois reversão do bloqueio por 18 h. Oócitos foram então fixados, corados por imunofluorescência para visualização da cromatina, localização e expressão das proteínas ERK1/2, ciclina B1 e p34^{cdc2} e preparados para avaliação da ultraestrutura por microscopia eletrônica. Observamos menor número de oócitos do grupo controle em MI ($C = 18,2 \pm 5,4 \%$). Maior quantidade de oócitos degenerados no grupo ROS ($16,3 \pm 5,6 \%$). Maior quantidade de oócitos em MI após 24 horas de maturação nos grupos controle e ROS, sendo $8,3 \pm 5,9 \%$ e $6,8 \pm 6,4 \%$, respectivamente. Apenas o grupo ROS bloq apresentou baixa expressão por intensidade de fluorescência da proteína ERK1/2 no ooplasma, o grupo imaturo apresentou elevada expressão da proteína ciclina B1 e proteína p34^{cdc2} a qual foi detectada em todos os oócitos avaliados, como maior expressão nos imaturos e as 6 h. Apenas o tratamento com ROS levou a menor expressão. Não ocorreu diferença na localização destas proteínas no ooplasma e não observamos alterações ultraestruturais oocitárias entre os tratamentos com exceção da associação de fármacos que provocou um excesso de metabolização de lipídeos. Estes resultados demonstram que vários caminhos estão envolvidos na regulação da maturação meiótica oócitos

bovinos. Alguns desses caminhos são independentes do MPF e, conseqüentemente, escapam do controle dos fármacos inibidores da CDK1, roscovitina e butirolactona I.

Palavras-chave: Oócitos, maturação *in vitro*, inibidores CDK1, fator promotor da maturação, bovinos

1. Introdução

Os oócitos de mamíferos mantêm-se presos na fase de diplóteno da prófase I e retomam espontaneamente a maturação meiótica uma vez libertos do ambiente folicular. Este processo de quebra da vesícula germinativa (QVG) é independente da estimulação de gonadotrofinas, sendo caracterizado pela condensação da cromatina e desaparecimento gradual do nucléolo e da carioteca [1, 2].

Ao longo da progressão da maturação nuclear, ocorre a extrusão do primeiro corpúsculo polar e novamente o oócito permanece parado na fase metáfase II retomando sua atividade no momento da fertilização. Nos oócitos dos mamíferos, durante o processo de maturação ocorre a migração dos grânulos corticais (GC), etapa importante na organização das organelas citoplasmáticas e preparação para a fertilização [3].

Durante a maturação, os GCs migram do local onde são produzidos, no complexo de Golgi, e se acomodam próximos a membrana plasmática [4]. Para que a fertilização seja bem sucedida, estas alterações citoplasmáticas têm que ocorrer sincronicamente com a maturação nuclear para que ocorra formação do zigoto e o desenvolvimento embrionário posterior [5].

Adicionalmente, para que ocorra a maturação oocitária, o fator promotor da maturação (MPF) que é formado por proteínas compostas por duas subunidades, a ciclina B1 e p34^{cdc2} precisa estar ativo. A atividade do MPF em oócitos é bem caracterizada em estudos que comparam oócitos incompetentes e competentes, demonstrando que o MPF induz a condensação da cromatina nuclear de oócitos imaturos. Portanto, a capacidade do oócito em retomar a meiose está associada à atividade do MPF e acontece de modo distinto entre as espécies.

O controle do ciclo celular meiótico depende das proteínas que constituem o MPF, a p34^{cdc2} e a ciclina B1, e também da MAPK, representada pelas proteínas p44 e p42 (ERK1 e ERK2). Além disso, a localização específica destas proteínas no citoplasma celular, também parece estar envolvida no controle de suas atividades durante o ciclo celular em oócitos e embriões [6].

O bloqueio meiótico tem sido utilizado como forma de permitir ao oócito maior tempo para adquirir a competência para o desenvolvimento antes de submetê-lo à maturação *in vitro* [6, 7]. Para tanto, tem-se utilizado inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CDK), como a roscovitina (ROS) e a butirolactona I (BL-I), as quais bloqueiam a atividade do fator promotor da maturação (MPF).

No entanto, estas drogas causam danos ultraestruturais aos oócitos [8, 9] que poderiam ser reduzidos ao diminuir a concentração das drogas utilizadas para bloquear a meiose, deste modo, a análise de tal impacto sobre as estruturas celulares é de fundamental relevância [7]. Proteínas do citoesqueleto [10, 11] e a distribuição das organelas [12, 13] são importantes para a maturação do oócito e podem afetar a competência de desenvolvimento até o estágio de blastocistos.

Autores têm demonstrado uma estreita relação entre a maturação e a dinâmica do citoesqueleto celular em suínos e bovinos [7, 14, 15]. O correto posicionamento das organelas indica melhor capacidade de desenvolvimento oocitário, visto que oócitos de menor qualidade apresentam, por exemplo, dificuldade na movimentação das mitocôndrias [12].

Frente ao exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do bloqueio meiótico de oócitos bovinos com os inibidores de CDK roscovitina (ROS) e butirolactona (BL-I) sobre a maturação nuclear, expressão das proteínas ERK 1 e 2, ciclina B1 e proteína p34^{cdc2}, localização das proteínas ERK 1 e 2, ciclina B1 e proteína

p34^{cdc2} e avaliar as alterações ultraestruturais provocadas pela utilização destes fármacos.

2. Material e Métodos

2.1 Coleta dos ovários, punção folicular e maturação *in vitro* (MIV)

Foram utilizados ovários de vacas obtidos de abatedouro comercial e transportados ao laboratório de FIV do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP-Botucatu. No laboratório, os ovários foram lavados com NaCl a 0,9 % na temperatura de 38 °C. Todos os folículos com diâmetro entre 2-8 mm foram aspirados com seringas de 10 mL e agulhas 40 x 12 mm.

Após a seleção, os oócitos foram lavados em meio HEPES (Gibco®) e transferidos para gotas de maturação *in vitro* (MIV – In Vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, Brasil). Os oócitos permaneceram em estufa com 5 % de CO₂ em ar, temperatura de 38,5°C e umidade absoluta.

Os oócitos foram divididos nos diferentes grupos submetidos à inibição da maturação nuclear.

2.2 Inibição meiótica

2.2.1 Roscovitina (Roscovitine R7772 Sigma ≥98)

Para bloquear a meiose, a roscovitina (ROS) foi adicionada ao meio de maturação na concentração de 12,5 µM por 6 horas e o tempo para reversão da meiose (meio MIV livre de ROS) foi de 18 horas.

2.2.2 Butirolactona I (BML-CC210-1000)

A butirolactona I (BL-I, Enzo Life Sciences International, Inc. 5120 Butler Pike Plymouth Meeting, PA 19462) foi adicionada ao meio de maturação na concentração de 50 μ M. O tempo de bloqueio meiótico de 6 horas e da reversão da meiose (meio de MIV livre de BL-I) foi de 18 horas.

2.2.3 Roscovitina + Butirolactona-I

A associação de ROS (ROS 6,25 μ M) e BL-I (BL-I 25 μ M) também foi realizada. O tempo de inibição da meiose foi de 6 horas e o tempo de reversão (meio MIV livre de ROS e BL-I) foi de 18 horas.

2.3 Avaliação do estágio de maturação nuclear

De cada grupo experimental foram retirados aleatoriamente oócitos com 0 (Imaturos), 6 e 24 horas de maturação ($n = 600$). As estruturas foram retiradas do meio MIV e transferidas ao meio TCM 199 Hepes[®] (Gibco 12340-03) com Hyaluronidase Tipo II para o desnudamento.

Os oócitos foram então transferidos para uma gota de 5 μ L de Hoechst 33342 (concentração de 0,01 mg/mL) em uma lâmina e cobertos com lamínula. Após 20 minutos a morfologia nuclear foi observada em microscópio invertido com luz fluorescente ultravioleta (Leica DMIRB) classificando-se o núcleo em Vesícula Germinativa (VG), Quebra da Vesícula Germinativa (QVG), Metáfase I (MI), Metáfase II (MII) e Degenerado ou Não Identificado (D/NI) (onda de excitação: 350 nm e onda de emissão: 461 nm).

2.4 Imunofluorescência para detecção da atividade e localização das proteínas ERK1/2, Ciclina B1 e p34^{cdc2}

Utilizou-se 50 oócitos por tratamento, em um total de 10 rotinas. Os oócitos foram fixados em BD Cytotfix® 554655 (solução de fixação – formaldeído 4,21 %) *overnight* a 4 °C. Em seguida, foram incubados com solução de TBS – Tween 20 (50 mM Tris, 150 mM NaCl e 0,05 % Tween 20) contendo 0,5 % de Triton X-100 e inibidor de protease (SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-Free, cod. S8830) por 2 horas a 4 °C juntamente com cada anticorpo específico:

- **ERK1/2**: diluição 1:50 – Novex by Life Technologies – Rabbit (polyclonal) Anti-ERK 1&2 [pTpY^{185/187}] Phosphorylation Site Specific Antibody Alexa Fluor® 488 Conjugate;

- **ciclina B1** 1:50 – Bioss – Rabbit Anti-Cyclin B1 Polyclonal Antibody;

- **p34^{cdc2}** 1:50 – Biolegend – Purified anti-cdc2 (p34);

Posteriormente foram corados com 2,5 µg/mL de Hoechst 33342 em 3:1 (v/v) glicerol/PBS. A avaliação foi feita em microscópio invertido a Laser Confocal da marca Leica TCS SP 5 (onda de excitação: 554 nm e onda de emissão: 576 nm).

2.5 Avaliação da ultraestrutura oocitária

Foram utilizados de 5 a 10 oócitos para cada grupo experimental. Os oócitos foram fixados por no mínimo 24 horas em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, com pH = 7,4. Durante o tempo de fixação estes foram incluídos em Agar a 2% o qual foi corado com azul de metileno para facilitar sua visualização. Após a lavagem, no mesmo tampão, os oócitos foram submetidos a pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% durante 3 horas a temperatura de 4°C. Foram então, lavados por 3 vezes em água bidestilada e iniciou-se a desidratação em séries crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) durante 5 minutos cada, repetindo-se a lavagem na concentração 100%

por 3 vezes. A polimerização foi feita com Araldite 502 durante 72 horas a temperatura de 60°C.

Para localização dos oócitos e seleção de campos significativos para os estudos ultraestruturais, foram obtidas secções semifinas (0,5 µm) primeiramente com navalha de vidro em ultramicrótomo. Os cortes ultrafinos foram obtidos com navalha de diamante e colhidos em grades de cobre, corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão modelo Tecnai Spirit da marca Fei Company.

2.6 Análise estatística

Para análise estatística os dados foram analisados utilizando o teste de Student Newman Keuls pelo PROC GLM do SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Foi utilizado teste descritivo para os dados numéricos. Os dados são apresentados como média e erro padrão. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 5%.

3. Resultados

3.1 Avaliação do estágio de maturação nuclear

De cada grupo experimental foram retirados aleatoriamente oócitos com 0 (Imaturos), 6 e 24 horas de maturação (n = 600), submetidos ou não ao bloqueio meiótico. Os oócitos foram avaliados em microscópio invertido com luz fluorescente ultravioleta (Leica DMIRB) com núcleos classificados em: Vesícula Germinativa (VG), Quebra da Vesícula Germinativa (QVG), Metáfase I (MI), Metáfase II (MII) e Degenerado ou Não Identificado (D/NI) (onda de excitação: 350 nm e onda de emissão: 461 nm).

Na tabela 1 estão descritos os dados observados em oócitos imaturos, maturados por 6 horas e os grupos tratados por 6 horas com ROS, BL-I e ROS + BL-I. Podemos

observar que no momento da aspiração folicular (Imaturos) grande quantidade de oócitos já se apresentava em estágio de QVG ($63,3 \pm 3,1$ %).

Quando avaliamos os dados de maturação nuclear entre o grupo controle 6 horas e os grupos tratados com fármacos inibidores por 6 horas observamos diferença no número de oócitos em MI. Verificamos que o grupo controle apresentou menor número de oócitos em MI (C= $18,2 \pm 5,4$ %; Tabela 1). Observamos também maior quantidade de oócitos degenerados no grupo ROS ($16,3 \pm 5,6$ %; Tabela 1).

Tabela 1: Avaliação da maturação nuclear com Hoechst 33342 de oócitos imaturos, oócitos maturados por 6 horas em presença de ROS, BL-I e ROS + BL-I. Total de 5 réplicas com 300 oócitos cada (média \pm erro padrão).

Tratamentos	Estágios de Desenvolvimento do Núcleo				
	VG	QVG	MI	MII	D/NI
Imaturo	$10,2 \pm 5,1$	$63,3 \pm 3,1$	$12,3 \pm 3,1^a$	$3 \pm 1,2$	$11,2 \pm 1,0^a$
Controle (6 horas)	$7,4 \pm 3,5$	$57,9 \pm 7,2$	$18,2 \pm 5,4^a$	$3,5 \pm 1,2$	$13,0 \pm 4,6^a$
ROS – Bloq	$6,8 \pm 4,5$	$49,1 \pm 7,2$	$26,8 \pm 6,7^b$	$1,0 \pm 1,2$	$16,3 \pm 5,6^b$
BL-I– Bloq	$8,6 \pm 4,5$	$58,1 \pm 7,2$	$22,1 \pm 6,7^b$	$1,2 \pm 1,2$	$10,0 \pm 5,6^a$
ROS + BL-I– Bloq	$12,5 \pm 4,5$	$57,8 \pm 7,2$	$20,1 \pm 6,7^b$	$1,6 \pm 1,2$	$8,0 \pm 5,6^a$

^{ab}Médias com sobrescritos incomuns, na mesma coluna, diferem ($P < 0,05$).

Imaturo: oócito recém-aspirado; **Controle (6 horas):** oócito maturado por 6 horas; **ROS-Bloq:** oócito bloqueado por 6 horas com ROS $12,5 \mu\text{M}$; **BL-I-Bloq:** oócito bloqueado por 6 horas com BL-I $50 \mu\text{M}$; **ROS + BL-I-Bloq:** oócito bloqueado por 6 horas com ROS ($6,25 \mu\text{M}$) e BL-I ($25 \mu\text{M}$).

Após a reversão da meiose os índices de M II observados foram semelhantes entre os grupos e entre estes e o grupo controle. Entretanto, nos grupos controle e ROS observamos maior quantidade de oócitos em MI após 24 horas de maturação ($P < 0,05$; Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação da maturação nuclear com Hoechst 33342, oócitos controle maturados por 24 horas, oócitos bloqueados por 6 horas com ROS, BL-I e ROS + BL-I seguido da maturação livre do agente por 18 horas. Total de 5 réplicas com 300 oócitos (média \pm erro padrão).

Tratamentos	Estágios de Desenvolvimento do Núcleo				
	VG	QVG	MI	MII	D/NI
Controle (24 horas)	0,0 \pm 1,3	0,8 \pm 1,8	8,3 \pm 5,9 ^a	82,6 \pm 6,3	8,3 \pm 2,4
ROS- Bloq/Rev	1,8 \pm 1,3	0,7 \pm 1,9	6,8 \pm 6,4 ^a	79,8 \pm 6,9	10,9 \pm 2,7
BL-I- Bloq/Rev	1,0 \pm 1,5	1,4 \pm 2,1	4,3 \pm 7,0 ^b	83,6 \pm 6,9	9,7 \pm 2,1
ROS + BL-I Bloq/Rev	1,3 \pm 1,4	1,0 \pm 1,9	4,1 \pm 6,4 ^b	85,0 \pm 6,9	8,6 \pm 2,8

^{ab}Médias com sobrescritos incomuns, na mesma coluna, diferem ($P < 0,05$).

Controle (24 horas): oócito maturado por 24 horas; **ROS-Bloq/Rev:** oócito bloqueado com ROS (12,5 μ M) por 6 horas e revertido por 18 horas; **BL-I-Bloq/Rev:** oócito bloqueado com BL-I (50 μ M) por 6 horas e revertido por 18 horas; **ROS + BL-I-Bloq/Rev:** oócito bloqueado com ROS (6,25 μ M) e BL-I (25 μ M) por 6 horas e revertido por 18 horas

3.2 Imunofluorescência para detecção da atividade e localização das proteínas ERK1/2, Ciclina B1 e p34^{cdc2}

3.2.1 Proteína ERK 1/2

A MAPK, representada pelas ERK 1 e 2, foi detectada em oócitos imaturos e maturados, tanto em oócitos do grupo controle quanto nos tratados (Tabela 3; Figuras 1, 2 e 3).

No grupo de oócitos imaturos, maturados por 6 horas e por 24 horas foram observadas diferenças na expressão dessas proteínas ($P < 0,05$). Nos oócitos imaturos (expressão da ERK = 61,04 \pm 12,8) e maturados por 24 horas (expressão da ERK = 70,6

± 20), observamos maior expressão do que em oócitos maturados 6 horas (expressão da ERK = $39,8 \pm 10,6$).

Tabela 3. Intensidade de fluorescência da proteína **ERK1/2** no ooplasma de oócitos imaturo, controle 6 horas, oócitos inibidos com ROS por 6 horas, BL-I por 6 horas e associação de ROS + BL-I por 6 horas. Oócitos do grupo controle maturados por 24 horas, revertidos dos grupos ROS, BL-I e ROS + BL-I por 18 horas. Total de 10 réplicas e $n = 20$ por grupo (média \pm erro padrão).

Tratamentos	Intensidade de Fluorescência ($\times 10^{-6}$)
Imaturo	$61,04 \pm 12,8^{ab}$
Controle 6 h	$39,8 \pm 10,6^b$
ROS – Bloq	$50 \pm 21,4^a$
BL-I – Bloq	$99,8 \pm 9,6^a$
ROS + BL-I – Bloq	$74,5 \pm 21^{ab}$
Controle 24 h	$70,6 \pm 20^{ab}$
ROS – Bloq/Rev	$76 \pm 32,6^{ab}$
BL-I – Bloq/Rev	$68,5 \pm 14,7^{ab}$
ROS + BL-I – Bloq/Rev	$63,2 \pm 29,6^{ab}$

^{ab}Médias com sobrescritos incomuns, na mesma coluna, diferem ($P < 0,05$).

Imaturo: oócito recém-aspirado; **Controle (6 horas):** oócito maturado por 6 horas; **ROS-Bloq:** oócito bloqueado por 6 horas com ROS 12,5 μ M; **BL-I-Bloq:** oócito bloqueado por 6 horas com BL-I 50 μ M; **ROS + BL-I-Bloq:** oócito bloqueado por 6 horas com ROS (6,25 μ M) e BL-I (25 μ M); **Controle (24 horas):** oócito maturado por 24 horas; **ROS-Bloq/Rev:** oócito bloqueado com ROS (12,5 μ M) por 6 horas e revertido por 18 horas; **BL-I-Bloq/Rev:** oócito bloqueado com BL-I (50 μ M) por 6 horas e revertido por 18 horas; **ROS + BL-I-Bloq/Rev:** oócito bloqueado com ROS (6,25 μ M) e BL-I (25 μ M) por 6 horas e revertido por 18 horas.

O grupo **ROS**, que representa os oócitos bloqueados por 6 horas (expressão da ERK = $50 \pm 21,4$) e oócitos com reversão da meiose por 18 horas (expressão da ERK = $76 \pm 32,6$) não apresentou diferença na expressão da ERK1/2 ($P > 0.05$) em relação aos oócitos imaturos (expressão da ERK = $61,04 \pm 12,8$). A proteína foi estável ao longo da maturação e não foi afetada pelo bloqueio meiótico.

A expressão da ERK1/2 nos oócitos tratados com **BL-I** avaliada com 6 horas (expressão da ERK = $99,8 \pm 9,6$) e avaliada com 24 horas (expressão da ERK = $68,5 \pm 14,7$) não diferiu em relação ao grupo de oócitos imaturos (expressão da ERK = $61,04 \pm 12,8$; $P > 0.05$). Esta proteína apresentou-se de forma estável ao longo da maturação e não foi afetada pelo bloqueio meiótico.

Da mesma forma nos grupos tratados com ROS e BL-I, a expressão da ERK1/2 em oócitos tratados pela associação de **ROS + BL-I** não foi afetada pelo bloqueio meiótico e apresentou-se de forma estável ao longo da maturação ($P > 0.05$). Os oócitos inibidos por 6 horas apresentaram $74,5 \pm 21$ de expressão da ERK 1/2 e aqueles revertidos por 18 horas apresentaram expressão da ERK 1/2 de $63,2 \pm 29,6$.

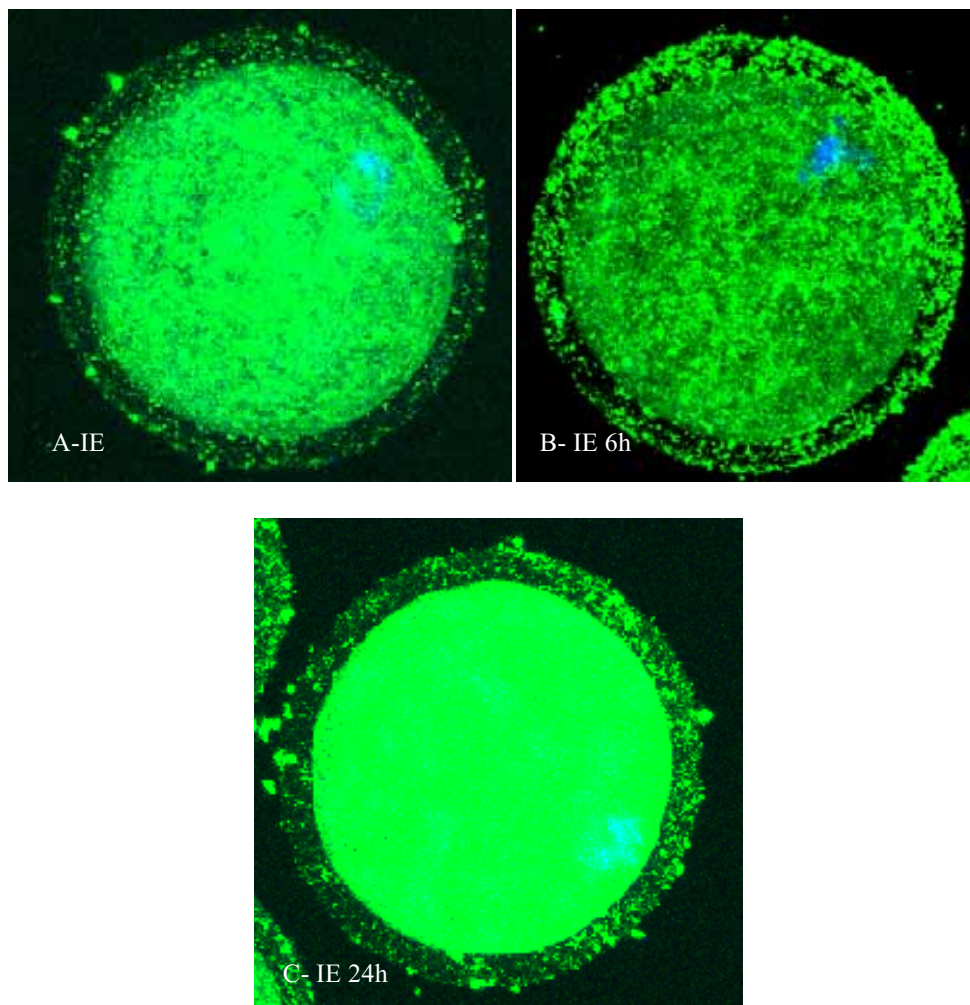


Figura 1: A. Oócitos imaturos. B. Oócitos maturados por 6 horas. C. Oócitos maturados por 24 horas. Identificação da proteína ERK1/2.

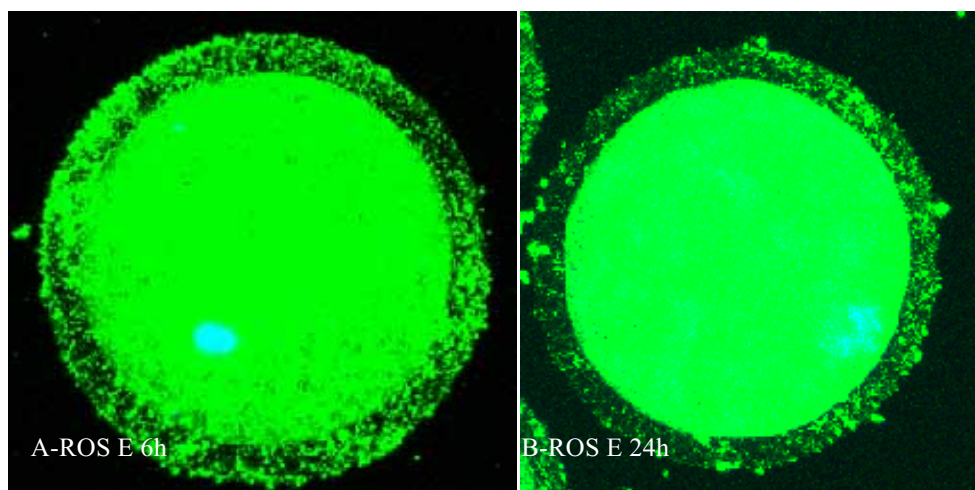


Figura 2: A. Oócitos bloqueados com ROS por 6 horas. B. Oócitos bloqueados com ROS por 6 horas e colocados em meio livre de fármaco por 18 horas. Identificação da proteína ERK1/2.

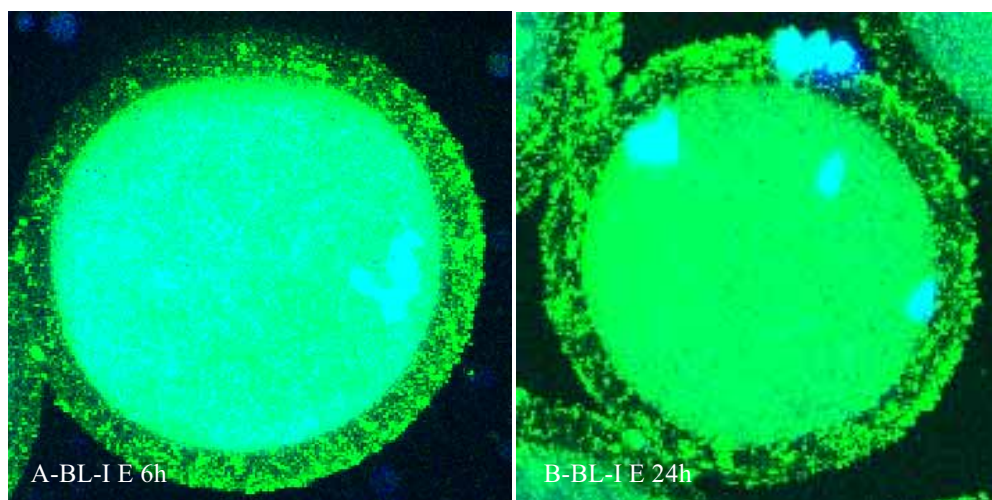


Figura 3: A. Oócitos bloqueados com BL-I por 6 horas. B. Oócitos bloqueados com BL-I por 6 horas e colocados em meio livre de fármaco por 18 horas. Identificação da proteína ERK1/2.

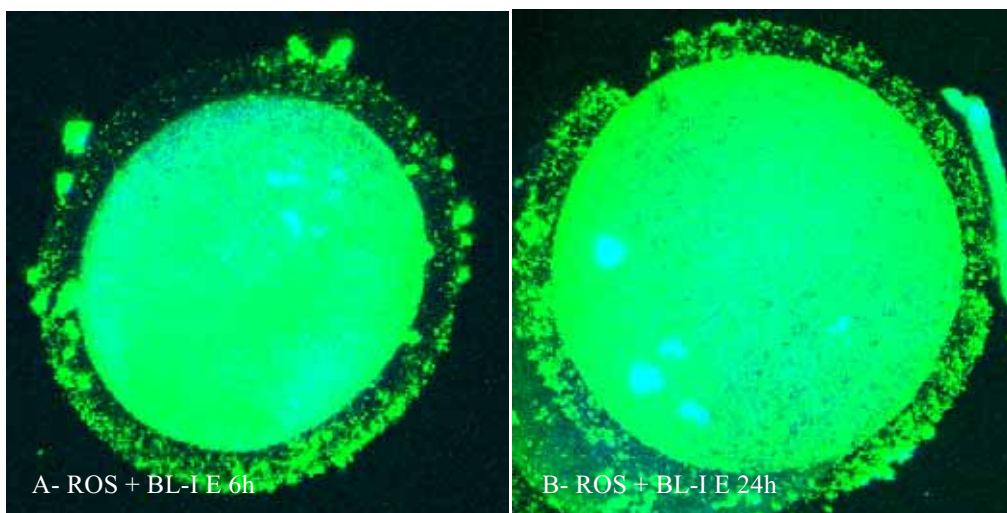


Figura 4: A. Oócitos bloqueados com ROS + BL-I por 6 horas. B. Oócitos bloqueados com ROS + BL-I por 6 horas e colocados em meio livre de fármaco por 18 horas. Identificação da proteína ERK1/2.

3.2.2 Proteína Ciclina B1

A expressão da proteína ciclina B1 foi detectada em todas as categorias de oócitos avaliadas e foi afetada pela inibição da maturação *in vitro* e pelo bloqueio da meiose (Tabela 4; Figuras 5, 6, 7, 8).

No grupo controle, representado pelos oócitos imaturos, maturados por 6 horas e 24 horas, observamos diferenças na expressão da ciclina B1 ($P < 0.05$). Os oócitos imaturos (expressão da ciclina B1 = $16,9 \pm 4$ %) foram os que apresentaram maior expressão desta proteína, tanto em relação aos maturados por 6 horas (expressão da ciclina B1 = $11,04 \pm 1,8$ %), como aos maturados por 24 horas (expressão da ciclina B1 = $7,7 \pm 1,9$ %). Não observamos diferença na expressão da ciclina B1 entre os oócitos maturados por 6 e 24 horas ($P > 0,05$).

Verificamos também diferença na expressão da ciclina B1 entre os oócitos imaturos e os tratamentos. Os oócitos imaturos apresentaram maior expressão desta proteína, em relação aos momentos 6 (expressão da ciclina B1 - BL-I = $6,4 \pm 0,6$ % e

ROS + BL-I = $8,3 \pm 0,9$ %) e 24 horas (expressão da ciclina B1 - BL-I = $10,1 \pm 1,5$ % e ROS + BL-I = $9,4 \pm 2,1$ %).

Tabela 4. Intensidade de fluorescência da proteína **Ciclina B1** no ooplasma de oócitos imaturo, controle 6 horas, oócitos inibidos com ROS por 6 horas, BL-I por 6 horas e associação de ROS + BL-I por 6 horas. Oócitos do grupo controle maturados por 24 horas, revertidos dos grupos ROS, BL-I e ROS + BL-I por 18 horas. Total de 10 réplicas e n = 20 por grupo (média \pm erro padrão).

Tratamentos	Intensidade de Fluorescência ($\times 10^{-6}$)
Imaturo	$16,93 \pm 4,0^a$
Controle 6 h	$11,04 \pm 1,8^b$
ROS – Bloq	$5,7 \pm 0,6^c$
BL-I – Bloq	$6,4 \pm 0,6^c$
ROS + BL-I – Bloq	$8,3 \pm 0,9^{bc}$
Controle 24 h	$7,7 \pm 1,9^{bc}$
ROS– Bloq/Rev	$8,8 \pm 0,9^{bc}$
BL-I – Bloq/Rev	$10,1 \pm 1,5^{bc}$
ROS + BL-I – Bloq/Rev	$9,4 \pm 2,1^{bc}$

^{ab}Médias com sobrescritos incomuns, na mesma coluna, diferem ($P < 0,05$).

Imaturo: oócito recém-aspirado; **Controle (6 horas):** oócito maturado por 6 horas; **ROS-Bloq:** oócito bloqueado por 6 horas com ROS 12,5 μ M; **BL-I-Bloq:** oócito bloqueado por 6 horas com BL-I 50 μ M; **ROS + BL-I-Bloq:** oócito bloqueado por 6 horas com ROS (6,25 μ M) e BL-I (25 μ M); **Controle (24 horas):** oócito maturado por 24 horas; **ROS-Bloq/Rev:** oócito bloqueado com ROS (12,5 μ M) por 6 horas e revertido por 18 horas; **BL-I-Bloq/Rev:** oócito bloqueado com BL-I (50 μ M) por 6 horas e revertido por 18 horas; **ROS + BL-I-Bloq/Rev:** oócito bloqueado com ROS (6,25 μ M) e BL-I (25 μ M) por 6 horas e revertido por 18 horas.

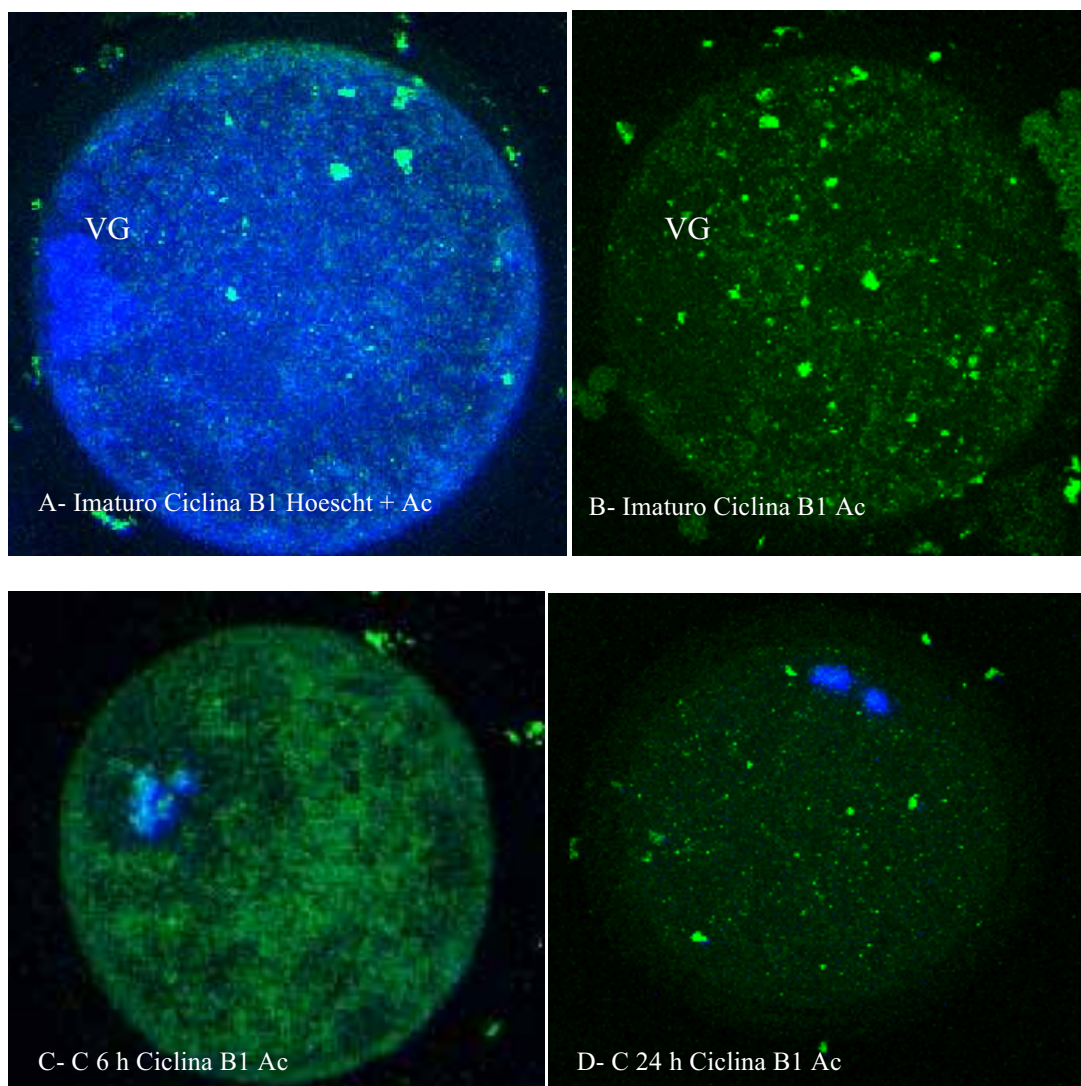


Figura 5: **A.** Oócitos imaturos corados com Hoescht e Anticorpo. **B.** Oócitos imaturos corados com Anticorpo. **C.** Oócitos maturados por 6 horas. **D.** Oócitos maturados por 24 horas. Identificação da proteína ciclina B1.

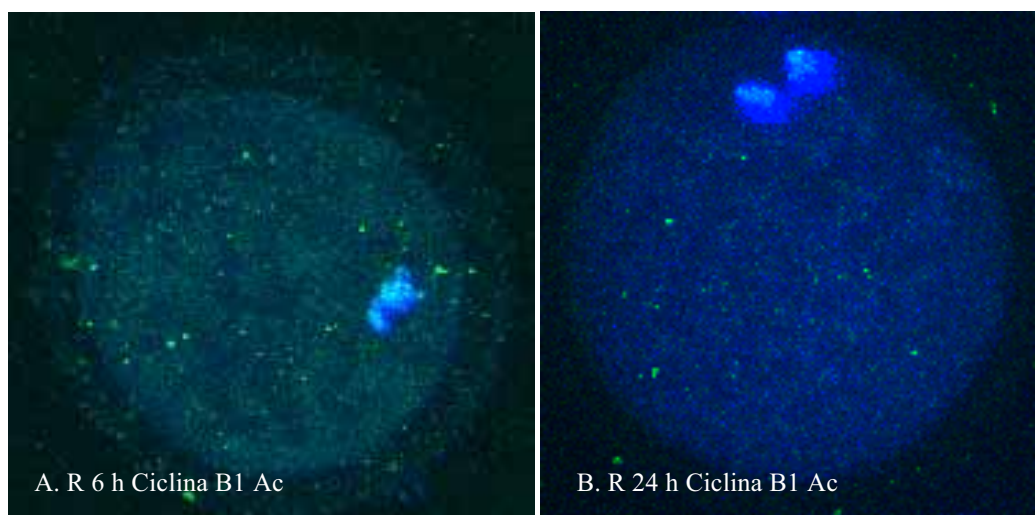


Figura 6: A. Oócitos bloqueados com ROS por 6 horas. B. Oócitos bloqueados com ROS por 6 horas e colocados em meio livre de fármaco por 18 horas. Identificação da proteína Ciclina B1.

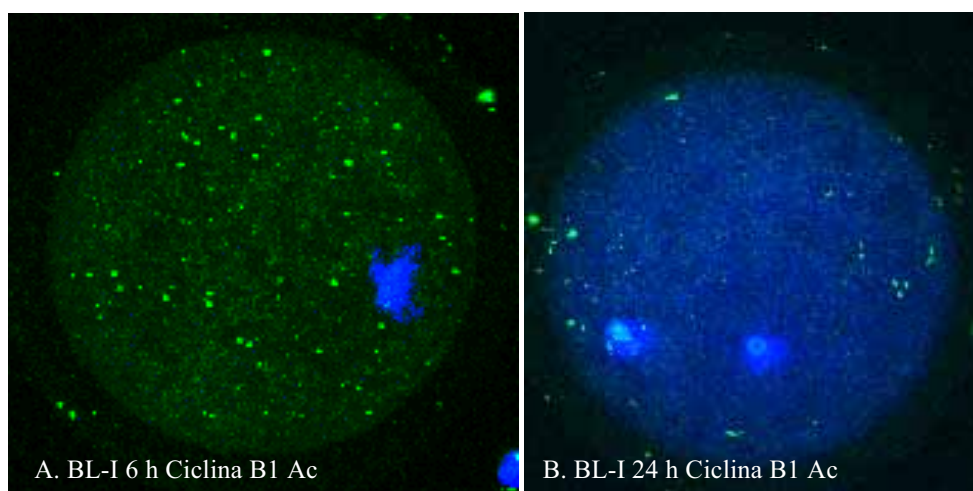


Figura 7: A. Oócitos bloqueados com BL-I por 6 horas. B. Oócitos bloqueados com BL-I por 6 horas e colocados em meio livre de fármaco por 18 horas. Identificação da proteína Ciclina B1.

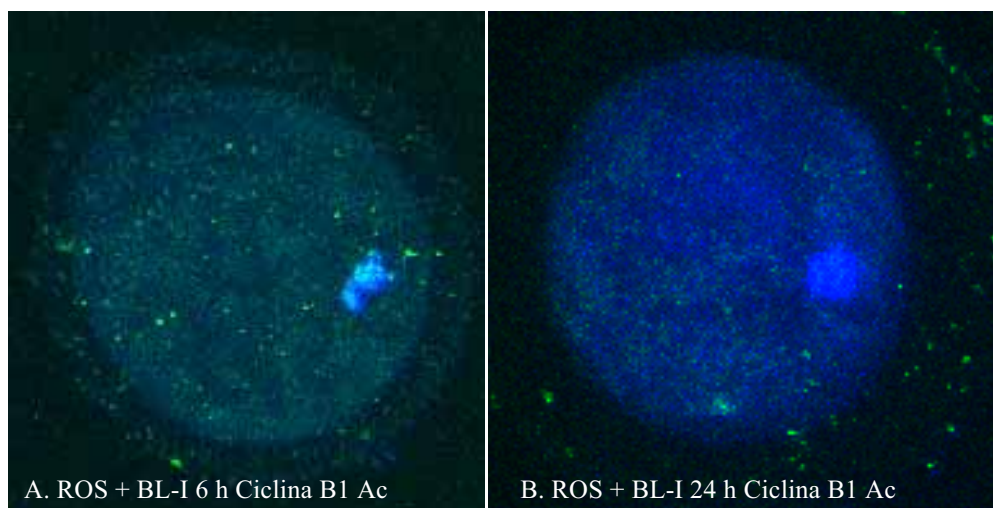


Figura 8: A. Oócitos bloqueados com ROS + BL-I por 6 horas. B. Oócitos bloqueados com ROS + BL-I por 6 horas e colocados em meio livre de fármaco por 18 horas. Identificação da proteína Ciclina B1.

3.2.3 Proteína p34^{cdc2}

A Proteína p34^{cdc2} foi detectada em todos os oócitos avaliados, tanto em imaturos, controle e bloqueados. Não se manteve estável, sendo afetada pelo processo de maturação *in vitro* e pelo bloqueio da meiose oocitária (Tabela 5; Figuras 9, 10, 11, 12; $P < 0,05$).

Os oócitos imaturos apresentaram maior expressão da proteína p34^{cdc2} ($15,4 \pm 2,5$ %) comparado a $11,7 \pm 1,0$ % do grupo 6 horas e $7,6 \pm 0,1$ % do grupo 24 horas.

No grupo ROS, os oócitos inibidos por 6 horas apresentaram menor expressão da p34 ($4,9 \pm 0,5$ %) comparado aos oócitos imaturos e similares ao grupo revertido por 18 horas ($6,4 \pm 0,8$ %). Quando comparado aos oócitos imaturos, o grupo revertido apresentou menor expressão da p34.

A expressão da p34 nos oócitos tratados com BL-I avaliados com 6 horas (expressão da p34 = $13,9 \pm 2,2$ %) e avaliados com 24 horas (expressão da p34 = $24,8 \pm 2,6$ %) diferiu entre si, ocorreu maior expressão da proteína na avaliação com 24 horas.

Em relação aos oócitos imaturos (expressão da p34 = $15,4 \pm 2,5$ %) ocorreu expressão similar aos oócitos tratados por 6 horas com BL-I e houve diferença entre imaturos e avaliados com 24 horas.

Nos grupos tratados com ROS + BL-I observamos que os oócitos imaturos apresentaram expressão similar desta proteína, em relação aos momentos 6 (expressão da p34 – ROS + BL-I = $14 \pm 0,9$ %) e maior expressão em relação ao grupo 24 horas (expressão da p34 – ROS + BL-I = $6,4 \pm 0,8$ %). Observamos também que com 6 horas, ocorreu maior expressão da proteína em relação à avaliação com 24 horas.

Tabela 5. Intensidade de fluorescência da **proteína p34^{cdc2}** no ooplasma de oócitos imaturo, controle 6 horas, oócitos inibidos com ROS por 6 horas, BL-I por 6 horas e associação de ROS + BL-I por 6 horas. Oócitos do grupo controle maturados por 24 horas, revertidos dos grupos ROS, BL-I e ROS + BL-I por 18 horas. Total de 10 réplicas e n = 20 por grupo (média ± erro padrão).

Tratamentos	Intensidade de Fluorescência (x10⁻⁶)
Imaturo	15,4 ± 2,5 ^b
Controle 6 h	11,7 ± 1,0 ^c
ROS – Bloq	4,9 ± 0,5 ^d
BL-I – Bloq	13,9 ± 2,2 ^{bc}
ROS + BL-I – Bloq	14 ± 0,9 ^{bc}
Controle 24 h	7,6 ± 0,1 ^d
ROS– Bloq/Rev	8 ± 1,9 ^d
BL-I – Bloq/Rev	24,8 ± 2,6 ^a
ROS + BL-I – Bloq/Rev	6,4 ± 0,8 ^d

^{ab}Médias com sobrescritos incomuns, na mesma coluna, diferem (P < 0,05).

Imaturo: oócito recém-aspirado; **Controle (6 horas):** oócito maturado por 6 horas; **ROS-Bloq:** oócito bloqueado por 6 horas com ROS 12,5 µM; **BL-I-Bloq:** oócito bloqueado por 6 horas com BL-I 50 µM; **ROS + BL-I-Bloq:** oócito bloqueado por 6 horas com ROS (6,25 µM) e BL-I (25 µM); **Controle (24 horas):** oócito maturado por 24 horas; **ROS-Bloq/Rev:** oócito bloqueado com ROS (12,5 µM) por 6 horas e revertido por 18 horas; **BL-I-Bloq/Rev:** oócito bloqueado com BL-I (50 µM) por 6 horas e revertido por 18 horas; **ROS + BL-I-Bloq/Rev:** oócito bloqueado com ROS (6,25 µM) e BL-I (25 µM) por 6 horas e revertido por 18 horas.

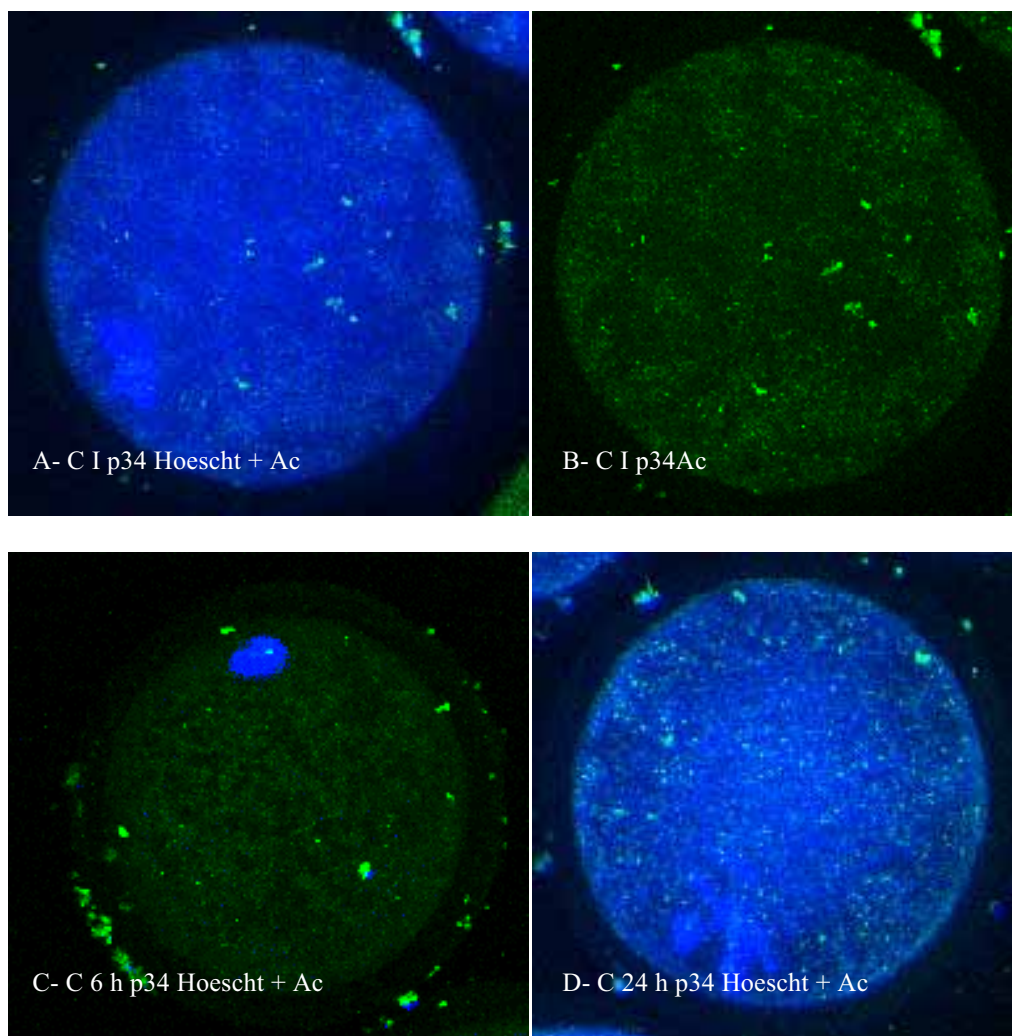


Figura 9: **A.** Oócitos imaturos corados com Hoescht e Anticorpo. **B.** Oócitos imaturos corados com Anticorpo. **C.** Oócitos maturados por 6 horas. **D.** Oócitos maturados por 24 horas. Identificação da proteína p34^{cdc2}.

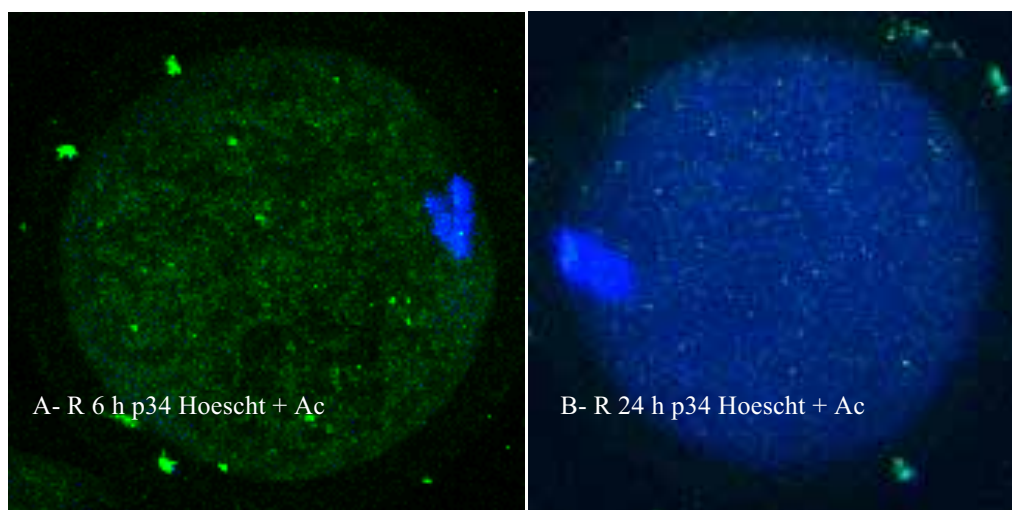


Figura 10: A. Oócitos bloqueados com ROS por 6 horas. B. Oócitos bloqueados com ROS por 6 horas e colocados em meio livre de fármaco por 18 horas. Identificação da proteína p34^{cdc2}.

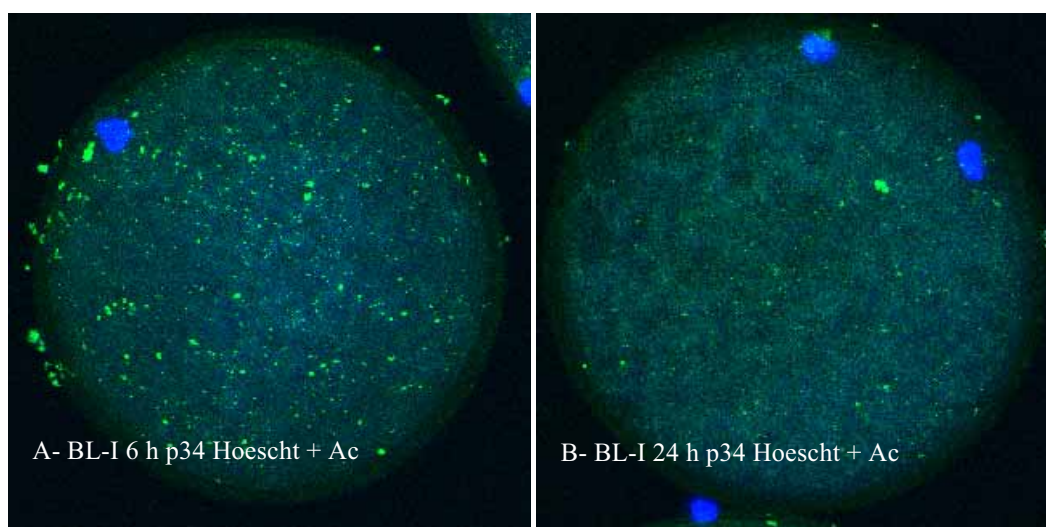


Figura 11: A. Oócitos bloqueados com BL-I por 6 horas. B. Oócitos bloqueados com BL-I por 6 horas e colocados em meio livre de fármaco por 18 horas. Identificação da proteína p34^{cdc2}.

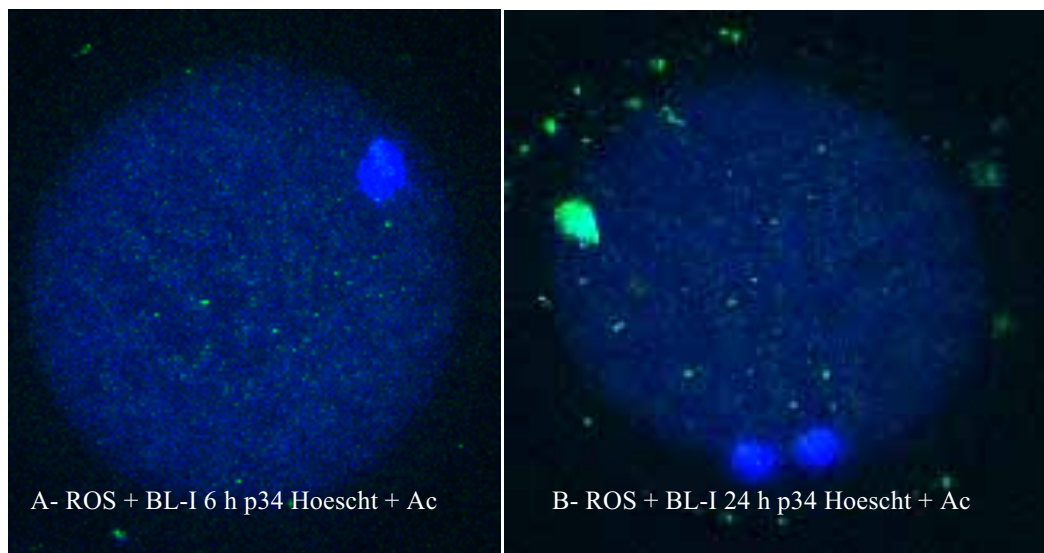


Figura 12: A. Oócitos bloqueados com ROS + BL-I por 6 horas. B. Oócitos bloqueados com ROS + BL-I por 6 horas e colocados em meio livre de fármaco por 18 horas. Identificação da proteína p34^{cdc2}.

3.3 Avaliação da ultraestrutura oocitária

Na análise ultraestrutural foi observado que o grupo de oócitos avaliados imediatamente após a aspiração (grupo Imaturo - 0 hora) apresentou células da granulosa mais compactas (Figura 13 A). Os grânulos corticais estavam localizados na região central do ooplasma em forma de “cluster” (Figura 13 B). Foi observada a presença de projeções das células do *cumulus* (PCCs) transpassando pela zona pelúcida (Figura 13 D). Além do mais, esse grupo de oócitos se caracterizou com um espaço perivitelínico maior que o grupo maduro (Controle – Figura 13 B, C e D).

No grupo de oócitos maturados por 6 horas (grupo Controle), observamos características de oócitos imaturos e início de características de maturidade. Verificamos que as células da granulosa iniciavam sua expansão mas seus prolongamentos através da zona pelúcida ainda eram evidentes (Figura 14 C). Observamos a presença de grânulos corticais, mitocôndrias e grânulos lipídicos na região central do ooplasma (Figura 14 A e B). Na figura 14 D observamos uma célula

da granulosa com núcleo bem evidente, retículo endoplasmático liso (REL) e gotas lipídicas.

Os oócitos que foram maturados por 24 horas (grupo Controle) apresentaram as células da granulosa bem expandida (Figura 15 A), com grânulos corticais na periferia do oócito (Figura 15 B e C) e muitas mitocôndrias adjacentes às gotas lipídicas (Figura 15 B e D). Observou-se também PCCs com projeções terminando no espaço perivitelínico (Figura 15 C).

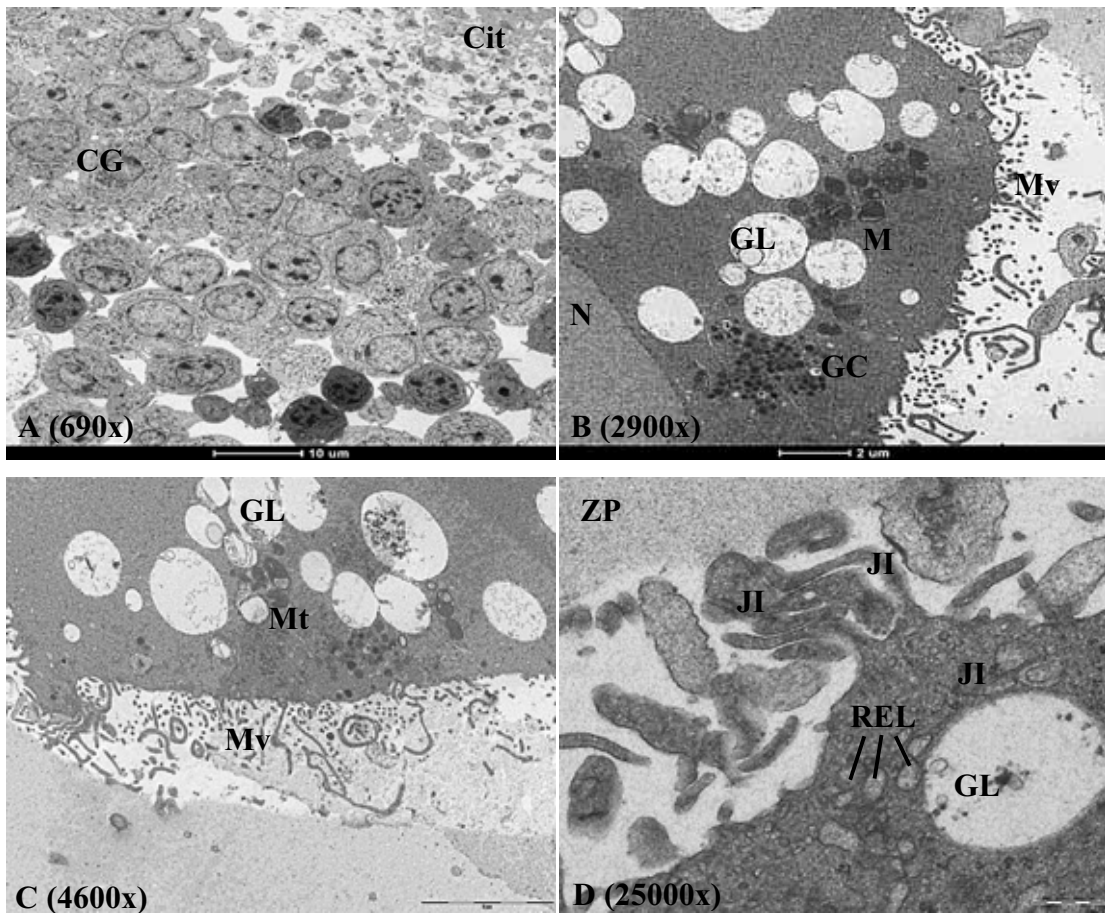


Figura 13: Avaliação em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de oócitos do grupo Imaturo (0 hora). **A:** células da granulosa (CG) bem compactas. **B:** presença de “clusters” de grânulos corticais (GC), mitocôndrias (Mt) e grânulos lipídicos (GL). **C:** espaço perivitelínico (EP) bem dilatado. **D:** presença de microvilosidades (Mv) e junções das células da granulosa do tipo junção intermediária (JI) e retículo endoplasmático liso (REL). Cit: citoplasma. ZP: zona pelúcida.

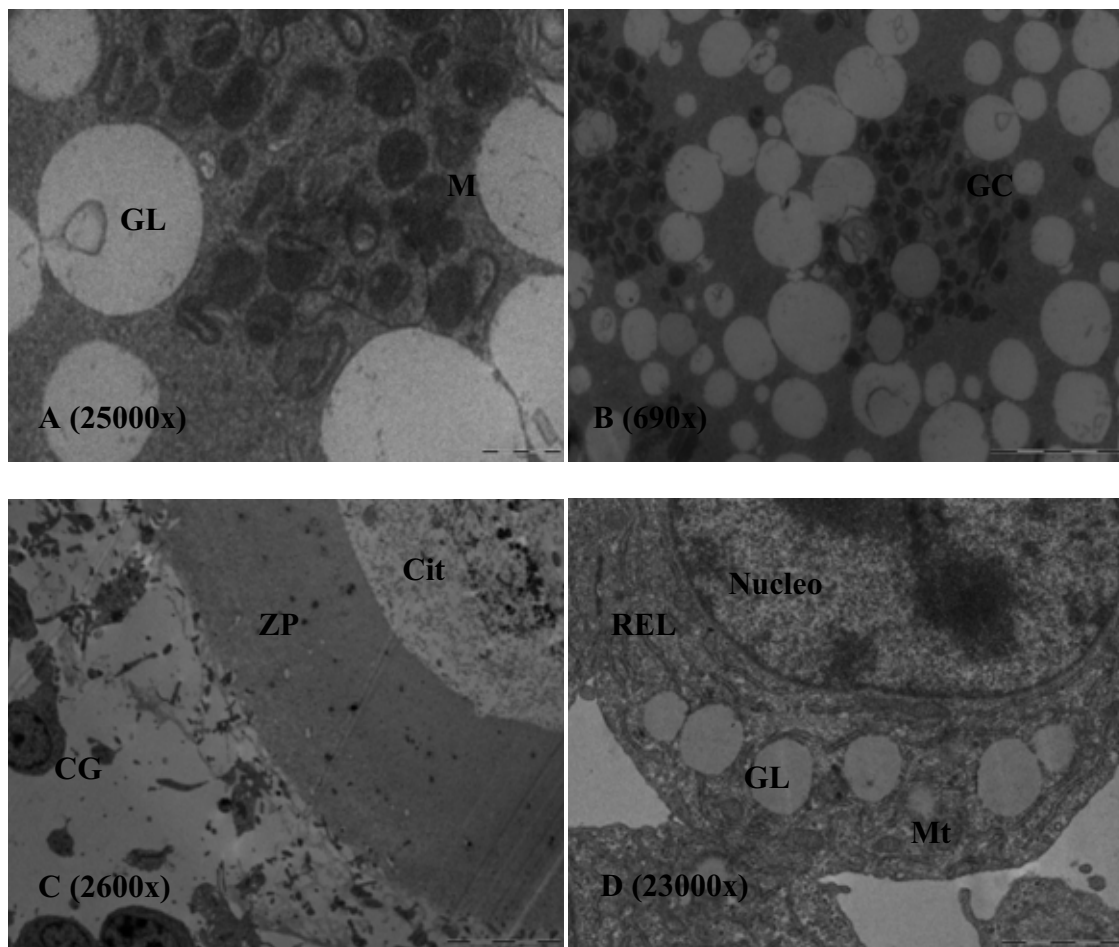


Figura 14: Avaliação em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de oócitos do grupo 6 horas. **A:** presença de grânulos corticais e mitocôndrias. **B:** presença de “clusters” de grânulos corticais (GC), mitocôndrias (Mt) e grânulos lipídicos (GL). **C:** células da granulosa (CG) bem dispersas, zona pelúcida (ZP) bem evidente. **D:** célula da granulosa, núcleo bem evidente, retículo endoplasmático liso (REL) e gotas lipídicas.

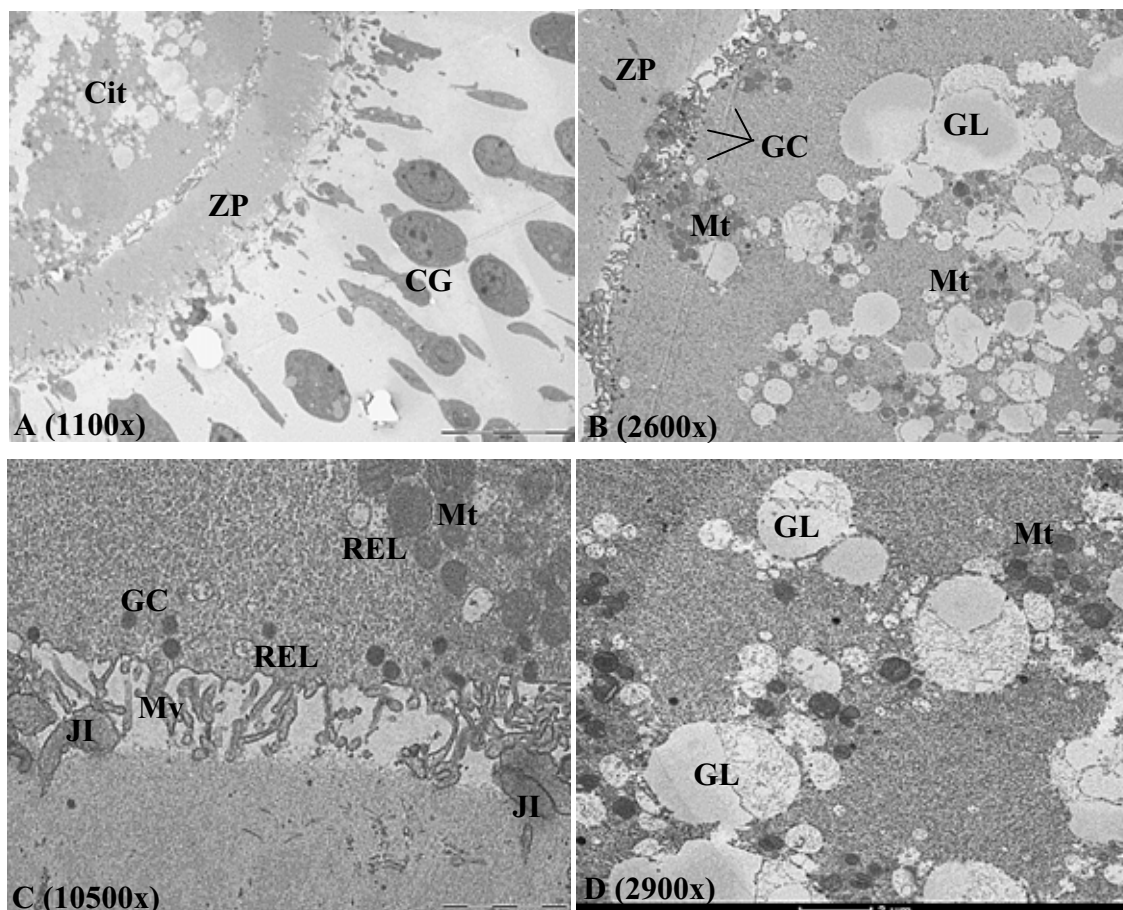


Figura 15: Avaliação em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de oócitos do grupo 24 horas. **A:** característica normal das células da granulosa (CG) após 24 horas de maturação, com aspecto expandido. **B:** citoplasma contendo associações de mitocôndrias (Mt) e grânulos lipídicos (GL). Observar que os “clusters” de grânulos corticais (GC) se desfizeram e se direcionaram para a periferia do ooplasma. **C:** resolução maior do ooplasma demonstrando a associação existente entre mitocôndrias (Mt) e retículo endoplasmático liso (REL), as junções intermediárias (JI) e os grânulos corticais (GC) periféricos. **D:** presença de grânulos lipídicos (GL) já em processo de metabolização pelas mitocôndrias (Mt). Cit: citoplasma. ZP: zona pelúcida.

Os oócitos do grupo ROS 12,5 μ M que foram bloqueados por 6 horas apresentaram distribuição dos grânulos corticais (GC) em “clusters” no interior do ooplasma. Estas distribuições das organelas citoplasmáticas indicam imaturidade oocitária similares às observadas no grupo controle, sem utilização de fármacos. Oócitos do grupo ROS bloqueados por 6 horas apresentaram uma distribuição homogênea dos grânulos lipídicos (GL), com mitocôndrias em grumos (Figuras 16 A e B).

Aqueles oócitos do grupo ROS que foram bloqueados por 6 horas e revertidos por 18 horas apresentaram características de maturidade oocitária semelhantes ao grupo controle (Figuras 16 C e D). Observamos que os grânulos corticais (GC) encontraram-se distribuídos próximos a zona pelúcida, mas ainda com tamanhos e eletrodensidades diferentes (Figura 16 C). Observamos também grande quantidade de microvilosidades no espaço perivitelínico (EP) e diminuição das organelas citoplasmáticas (Figura 16 D).

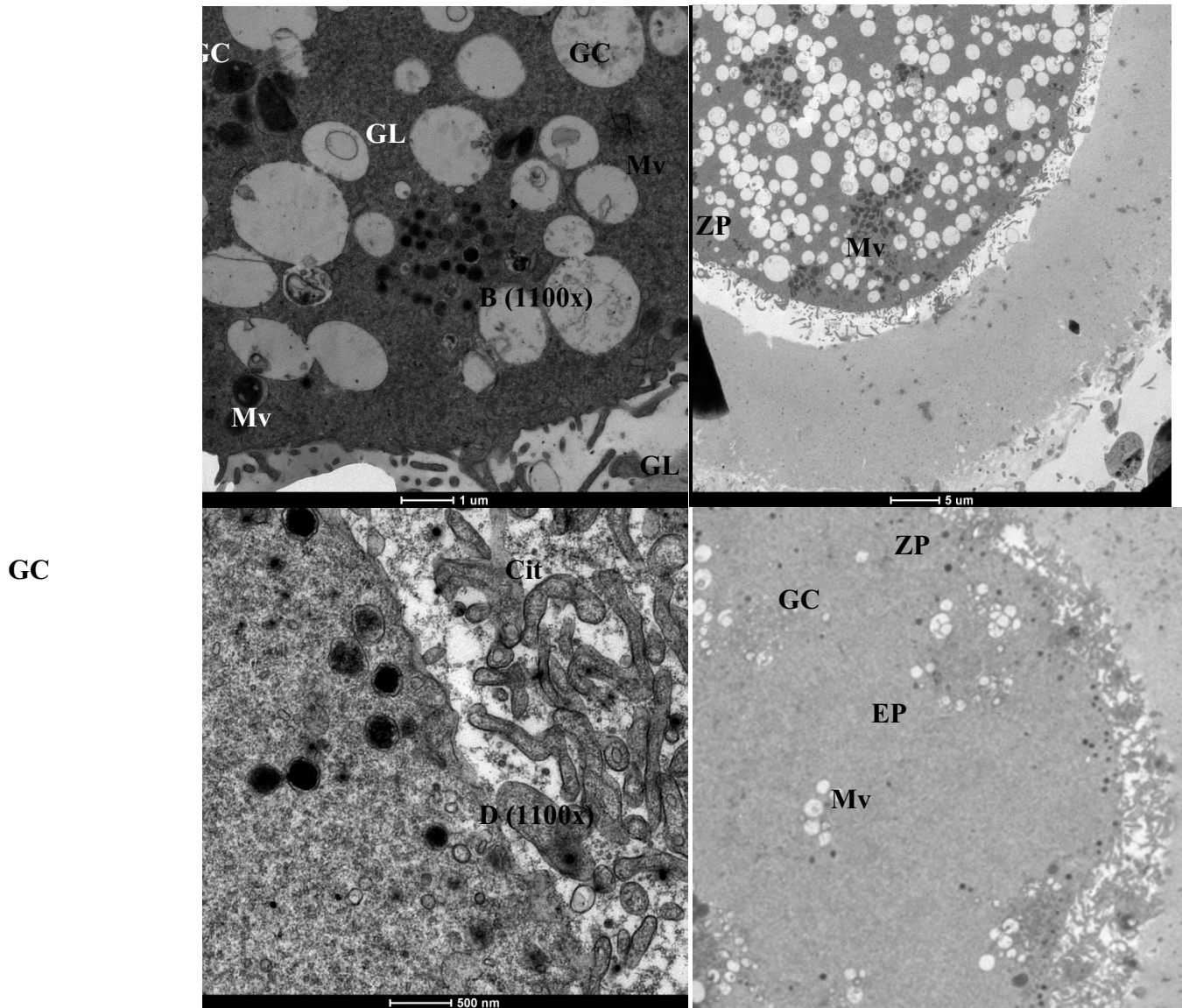


Figura 16: Avaliação em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de oócitos do grupo ROS somente bloqueados (A e B) e bloqueados e revertidos (C e D). **A:** Oócitos do grupo ROS 12,5 μM foram bloqueados por 6 horas – apresentaram distribuição dos grânulos corticais (GC) em “clusters” no interior do citoplasma. **B:** Oócitos do grupo ROS que foram bloqueados por 6 horas – apresentaram uma distribuição homogênea dos grânulos lipídicos (GL), com mitocôndrias em grumos. **C:** Oócitos do grupo ROS que foram bloqueados por 6 horas e revertidos por 18 horas. Observar que os grânulos corticais (GC) se encontravam distribuídos próximos a zona pelúcida, mas ainda com tamanhos e eletrodensidades diferentes. Foram vistas grande quantidade de microvilosidades. **D:** Oócitos do grupo ROS que foram bloqueados por 6 horas e revertidos por 18 horas – apresentaram uma diminuição das organelas citoplasmáticas e espaço perivitelínico (EP) repleto de microvilosidades (Mv).

Os oócitos do grupo BL-I bloqueados por 6 horas apresentaram características de imaturidade citoplasmática, similares ao grupo controle e ao grupo ROS (Figuras 17 A e B). Estes oócitos apresentaram uma boa preservação do citoplasma com inúmeras cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER) (Figura 17 A). Além disso, observamos a presença de grânulos lipídicos (GL), microvilosidades (Mv) e grânulos corticais.

Verificamos que os oócitos do grupo BL-I que foram bloqueados por 6 horas e revertidos por 18 horas apresentaram características normais das células da granulosa (CG) após 24 horas de maturação, com aspecto expandido (Figura 17 C). Observamos também a presença de grânulos corticais (GC) ainda em “clusters”, mitocôndrias (Mt), retículo endoplasmático liso (RE) e grânulos lipídicos (GL) (Figura 17 D).

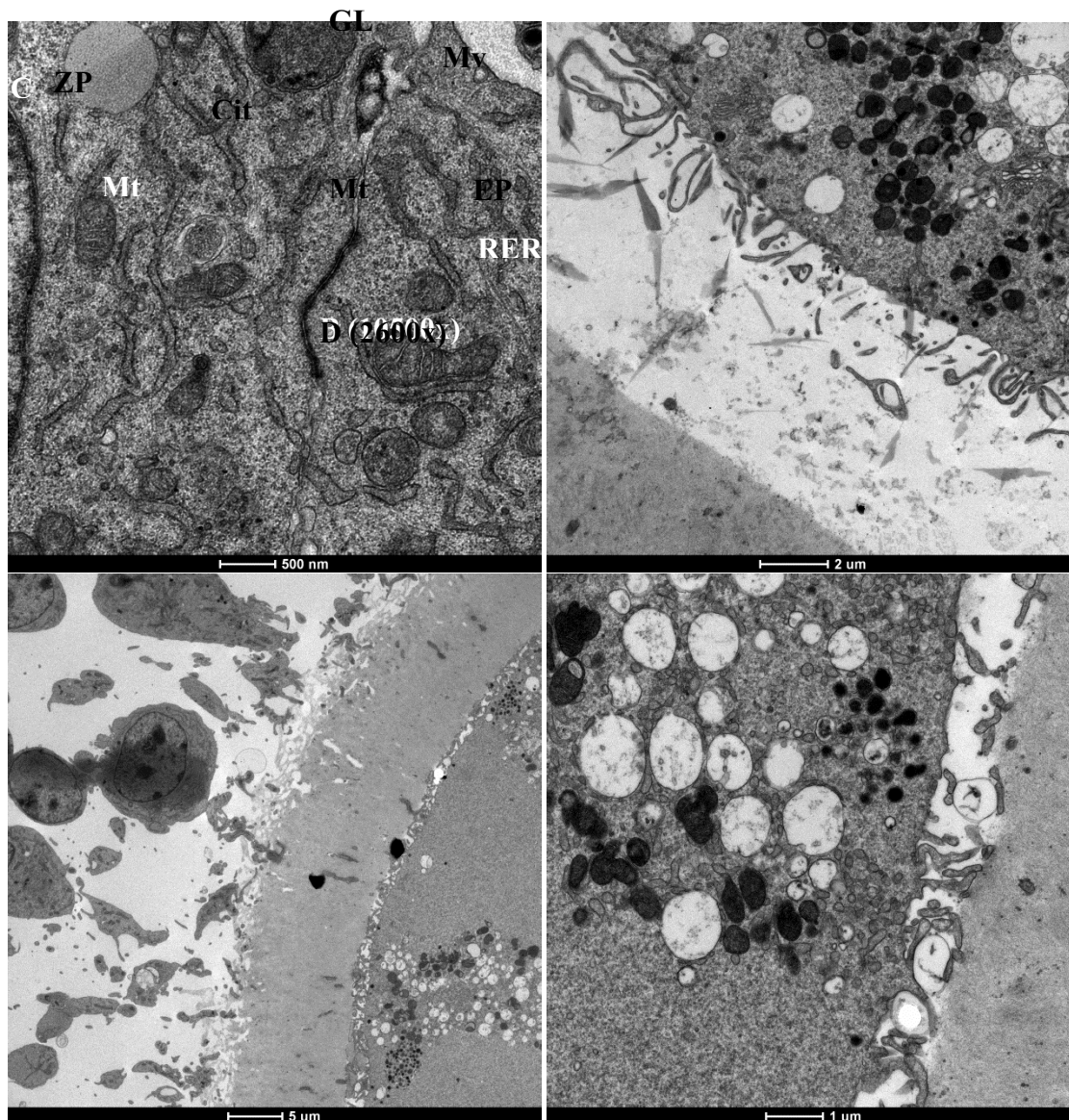


Figura 17: Avaliação em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de oócitos do grupo BL-I somente bloqueados (A e B) e bloqueados e revertidos (C e D). **A:** Oócitos do grupo BL-I 50 μ M foram bloqueados por 6 horas – apresentaram uma boa preservação do citoplasma com inúmeras cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER). **B:** Oócitos do grupo BL-I que foram bloqueados por 6 horas, presença de grânulos lipídicos (GL), microvilosidades (MV) e presença de grânulos corticais. **C:** Oócitos do grupo BL-I que foram bloqueados por 6 horas e revertidos por 18 horas – característica normal das células da granulosa (CG) após 24 horas de maturação, com aspecto expandido. **D:** Oócitos do grupo BL-I que foram bloqueados por 6 horas e revertidos por 18 horas, presença de grânulos corticais (GC) ainda em “clusters”, mitocôndrias (Mt), retículo endoplasmático liso (RE) e grânulos lipídicos (GL).

Na Figura 18 verificamos oócitos do grupo ROS + BL-I bloqueados (A e B) e bloqueados e revertidos (C e D). Os oócitos do grupo que foi bloqueado por 6 horas apresentaram células da granulosa (CG) bem compactas (Figura 18 A). Entretanto, verificamos que neste grupo de oócitos ocorreu uma alta metabolização dos grânulos lipídicos (GL), demonstrado pela grande desorganização do citoplasma (Cit) e completa ausência de microvilosidades (Figura 18 B).

Os oócitos do grupo ROS + BL-I que foram bloqueados por 6 horas e revertidos por 18 horas foi observado que os “clusters” de grânulos corticais (GC) se desfizeram e se direcionaram para a periferia do ooplasma, características verificadas em oócitos maturados (Figura 18 C). Notamos também a formação de unidades metabólicas formadas por mitocôndrias (Mt), retículo endoplasmático liso (RE) e grânulos lipídicos (GL) (Figura 18 D) o que reforma a ocorrência de maturidade oocitária.

(1100x)

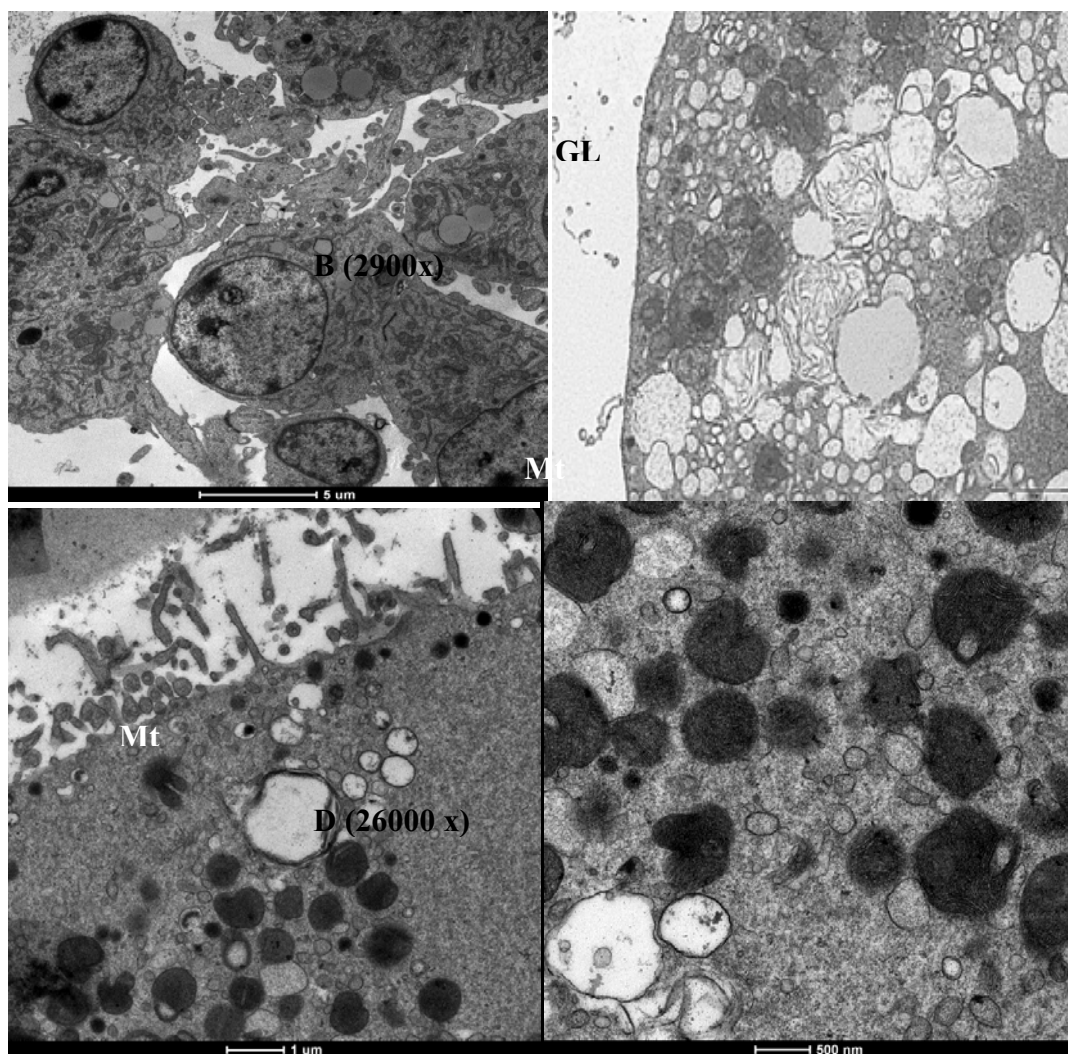


Figura 18: Avaliação em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de oócitos do grupo ROS + BL-I somente bloqueados (A e B) e bloqueados e revertidos (C e D). **A:** Oócitos do grupo ROS (6,25 μM) + BL-I (25 μM) foram bloqueados por 6 horas células da granulosa (CG) bem compactas. **B:** Oócitos do grupo ROS + BL-I que foram bloqueados por 6 horas – apresentaram uma alta metabolização dos grânulos lipídicos (GL), demonstrado pela grande desorganização do citoplasma (Cit) e completa ausência de microvilosidades. **C:** Oócitos do grupo ROS + BL-I que foram bloqueados por 6 horas e revertidos por 18 horas –. Observar que os “clusters” de grânulos corticais (GC) se desfizeram e se direcionaram para a periferia do ooplasma **D:** Oócitos do grupo ROS + BL-I que foram bloqueados por 6 horas e revertidos por 18 horas – observar a formação de unidades metabólicas formadas por mitocôndrias (Mt), retículo endoplasmático liso (RE) e grânulos lipídicos (GL).

4. Discussão

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da pré-maturação com roscovitina (ROS), butirolactona I (BL-I) e suas associações (ROS + BL-I), seguidos da maturação *in vitro*, na progressão da meiose (maturação nuclear), na morfologia de distribuição das organelas citoplasmáticas e na expressão e localização das proteínas constituintes do MPF e da proteína ERK 1 e 2 utilizando oócitos bovinos como modelo experimental.

Inicialmente demonstramos que no momento da aspiração folicular (Imaturos) grande quantidade de oócitos já se apresentava em estágio de QVG ($63,3 \pm 3,1$ % - Tabela 1). Quando avaliamos os dados de maturação nuclear entre o grupo controle 6 horas e os grupos tratados com fármacos inibidores por 6 horas observamos diferença no número de oócitos em MI. Verificamos que o grupo controle apresentou menor número de oócitos em MI ($C= 18,2 \pm 5,4$ %). Observamos também maior quantidade de oócitos degenerados no grupo ROS ($16,3 \pm 5,6$ %).

Oócitos mantidos livre de fármacos por 18 horas ao serem comparados ao grupo controle, maturado por 24 horas, apresentaram diferenças estatísticas, conforme demonstrado na tabela 2. Verificamos maior quantidade de oócitos em MI após 24 horas de maturação nos grupos controle e ROS ($8,3 \pm 5,9$ % x $6,8 \pm 6,4$ %). Estes dados, entretanto, estão de acordo ao relatado por Ferreira et al. [16] em que grupos tratados com BL-I por 18 ou 24 horas apresentaram 9,6 % e 8,1 %, respectivamente, dos oócitos em MI mesmo após 24 horas de maturação.

Segundo Sirard e First [17] elevados números de oócitos já podem apresentar o núcleo em quebra de vesícula germinativa (QVG) imediatamente após a aspiração folicular. Isto foi observado no presente estudo e em outros realizados em nosso laboratório. Possivelmente, a demora do abatedouro até o laboratório, favorece a

maturação precoce, pelos processos *pos-mortem* do animal. Outro fator considerado é o critério para definição de QVG, em que o simples ondulamento da membrana nuclear e início da condensação dos cromossomos já são considerados como o início do processo de meiose.

Além dos fatores já citados, o bloqueio da meiose neste experimento foi realizado na presença do FSH, o qual pode atuar como ativador da PDE induzindo parcialmente a degradação de cAMP, e portanto favorecendo a maturação oocitária, apesar da presença dos fármacos inibidores da meiose.

Vários estudos têm relatado a aceleração da cinética de maturação após o bloqueio meiótico, o que pode levar ao envelhecimento do oócito pelo tempo prolongado em meio de cultivo [7, 18, 19]. Em contrapartida, Ferreira et al. [16] não observaram diferença relacionada ao tempo de cultivo dos oócitos, o que causaria danos sobre no fuso meiótico, tanto em grupo bloqueado com BL-I por 18 ou 24 horas. No presente estudo não verificamos aceleração na maturação nuclear, visto que após 24 horas de MIV todos os grupos apresentaram dados similares de oócitos em MII.

Neste estudo, avaliamos a expressão e a localização das proteínas ERK 1 e 2, da proteína ciclina B1 e da proteína p34^{cdc2} de oócitos bovinos submetidos ao bloqueio meiótico com os fármacos BL-I e ROS. Relatamos que ocorreram diferenças na expressão destas proteínas, nos diversos grupos, entretanto, não observamos diferenças na localização das proteínas no ooplasma.

As transições do ciclo celular em células eucariotas são controladas por uma família de proteínas quinases dependentes de ciclina (CDK) e de seu parceiro de ligação a proteína ciclina. O complexo ciclina B1 e proteína p34^{cdc2} são necessários para a transição da fase G2 para a fase M. A regulação da atividade da p34^{cdc2} é crucial para

aexecução adequada da mitose e também é regulada pelos níveis de ciclina B1 e por múltiplas fosforizações da proteína p34^{cdc2} [20].

Uma vez que no presente estudo, grandes números de oócitos já se encontravam em QVG no momento da coleta, era de se esperar que os níveis de ERK em oócitos imaturos também fossem elevados. De fato, de acordo com Kubelka et al. [21] oócitos bovinos iniciam o processo de QVG 7 a 8 horas após serem colocados em meio de MIV, com 12 a 14 horas, os oócitos começam a atingir o estágio de MI. Subsequentemente, a sincronização das células durante a progressão do ciclo, os níveis de ERK diminuem. No entanto, por volta das 14 a 16 horas, mais oócitos atingem a fase anáfase I/telófase I e com 24 horas de maturação, a maioria dos oócitos já atingiram o estágio de MII. A ativação da p34^{cdc2} começa a se elevar com 7 horas, momento em que se inicia a QVG e a sua progressão até MI, já a MAPK começa sua atividade ao redor de 8 horas de maturação.

No entanto, no presente experimento, oócitos do grupo controle analisados após 6 horas de maturação, apesar dos altos índices de QVG, foi observado um baixo nível de ERK. Estes resultados contrastam com os de Fissore et al. [22] que observaram que após 9 horas de cultivo o aumento da MAPK se correlaciona com a QVG. Por outro lado, outros trabalhos demonstram que a ativação das proteínas ERK1 e ERK2 não se mantêm constante estando correlacionada a proteína p34^{cdc2} [21].

Nos oócitos imaturos, a disponibilidade da proteína ciclina B1 e da proteína p34^{cdc2} parece ser elevada, havendo posteriormente sua ligação para formação para formação do MPF ativo [23]. De fato, no presente experimento, isto foi comprovado, uma vez que os níveis destes compostos estavam mais elevados em oócitos imaturos em comparação com os momentos 6 e 24 horas.

Com relação à proteína ciclina B1 seus níveis não foram afetados pelas drogas bloqueadoras da meiose uma vez que seus níveis após o tratamento se apresentaram semelhantes aos observados em oócitos do grupo controle submetidos a 6 ou até a 24 horas de maturação. Por outro lado, os níveis de proteína p34^{cdc2} sofreram efeito substancial, tanto da maturação, quanto dos tratamentos.

Durante a maturação observou-se um decréscimo nos níveis de proteína p34^{cdc2} com os maiores níveis sendo observados em oócitos imaturos, níveis medianos após 6 horas de maturação e os níveis mais baixos após 24 horas de MIV, isso indica que com a ativação do MPF e QVG se inicia uma diminuição dos níveis da p34^{cdc2} livres e essa queda é mais elevada quando os oócitos atingem a MII.

Da mesma forma, a inibição da meiose com BL-I e com a associação de ROS e BL-I influenciaram os níveis da proteína p34^{cdc2}. O tratamento com esses indutores do bloqueio meiótico levou a manutenção de índices da p34^{cdc2} semelhantes aos observados às 6 horas de MIV, ou seja, compatíveis com o momento da QVG, o que está de acordo com o observado no estágio de maturação nuclear dos oócitos dos grupos tratados. No entanto, as razões pelas quais os níveis da p34^{cdc2} se elevaram tanto no grupo tratado com BL-I, que sofreu reversão da meiose, são difíceis de explicar.

Kubelka et al. [21] relata que a BL-I inibiu a proteína p34^{cdc2}, o que também resultou na inibição de MAPK. A incapacidade de BL-I para inibir a MAPK em extratos derivados oócitos bloqueados em MII minimiza a probabilidade de que a BL-I possa inibir diretamente a MAPK durante a maturação. Além disso, a BL-I induz a inibição da QVG de oócitos bovinos, o que não foi possível utilizando ácido ocadáico (AO) e nos oócitos tratados simultaneamente com BL-I e AO, em que a atividade da p34^{cdc2} e da MAPK permaneceram baixas. Isto contrasta com os dados do presente experimento,

entretanto as metodologias utilizadas são extremamente diferentes e, portanto os resultados não podem ser comparados diretamente.

Para a quantificação da intensidade da expressão das proteínas do presente trabalho, foi utilizada microscopia confocal. Este aparelho, uma vez em que são obtidas secções óticas, a quantificação do sinal é diretamente proporcional à concentração de proteínas, por conseguinte, os dados obtidos a partir desse aparelho podem ser comparados a ensaios de imunomarcção (immunoblotting) [24].

Os mecanismos de ativação do MPF foram estudados em oócitos de várias espécies de mamíferos e diferenças específicas foram identificadas entre elas. Em camundongos, os oócitos são dependentes da síntese de p34^{cdc2} para retomar a meiose, em caprinos, a ciclina B1 e p34^{cdc2} foram encontradas, tanto em oócitos maduros como imaturos sugerindo que a síntese de proteína adicional e / ou modificações de proteínas podem ser necessárias para permitir a formação e ativação do MPF [25].

Utilizando a microscopia de imunofluorescência e confocal, autores demonstraram que a ERK1/2 está localizada uniformemente no citoplasma e no núcleo de repouso (G0) de células humanas. Após 5 minutos de estimulação com soro, a ERK1/2 esta concentrada no núcleo e permanece lá por 2 horas. No entanto, quantidade considerável de ERK1/2 mantém-se no citoplasma e parte se concentra no núcleo, durante o período de G1, após suas respectivas atividades, a quinase começa a retornar para níveis basais [26].

As proteínas fosforiladas migram mais lentamente que as não fosforiladas durante a eletroforese em gel de poliacrilamida. Com base nesta metodologia autores demonstraram que a estimulação pelo soro leva a um aumento da ERK1/2 tanto no citoplasma e como em frações nucleares. Em outro estudo, autores demonstraram que a translocação nuclear da ERK1/2 é necessária para a transcrição do gene Elk1 em

resposta ao tratamento com SFB. Este achado sugere que a translocação nuclear da ERK1/2 é um pré-requisito para muitas respostas fisiológicas após a estimulação celular [26].

Em relação a ERK1/2 observamos que a proteína fosforilada estava expressa em oócitos imaturos e maturados, submetidos ou não ao bloqueio meiótico. Outros autores verificaram que a MAPK apresentou transcritos em oócitos imaturos [6, 25]. Em oócitos do grupo controle maturados por 6 horas, verificamos uma redução na expressão desta proteína, o que diferenciou dos outros tratamentos. Nos demais grupos, observamos regularidade na expressão desta proteína, como valores similares em todas as avaliações.

Autores relatam que a atividade da MAPK apresentou padrão similar durante a maturação oocitária. A atividade desta proteína é baixa em oócitos imaturos e torna-se ativa por volta do período de quebra de VG, similar ao observado com o MPF. A partir daí mantém-se elevada até o final da maturação [6, 21]. Este comportamento não foi observado no presente estudo, em que todos os grupos apresentaram atividade similar da ERK1/2 e somente o grupo maturado por 6 horas apresentou queda na expressão da proteína.

Quetglas et al. [6] e Kubelka et al. [21] verificaram uma redução dos transcritos da MAPK após a maturação e descrevem que essa proteína parece se enquadrar na categoria de degradadores ao longo da maturação, sendo mais provável que estes estejam sendo transcritos visto que estas proteínas foram detectadas em oócitos maturados, assim como no presente experimento.

Motlik et al. [27] e Imai et al. [28] descreveram que o uso da BL-I não prejudicou o desenvolvimento embrionário. Adicionalmente, Kubelka et al. [21] demonstraram que esta inibição ocorreu pela falha na atividade da proteína p34^{cdc2} e da

MAPK, no presente estudo verificamos que o tempo de 6 horas com o uso dos fármacos não inibiu a ação destas proteínas. Mermillod et al. [29] investigaram que o uso de roscovitina inibiu a atividade das quinases dependentes de ciclina com resultados encorajadores.

A maioria dos estudos não conseguiu demonstrar qualquer melhoria na capacidade de desenvolvimento embrionário com a utilização dos fármacos inibidores da meiose [21, 29, 30, 31]. Além disso, muitos estudos indicam que a progressão meiótica parece ocorrer durante a inibição [9, 31, 32].

Outro estudo demonstrou que alguns eventos relacionados com a retomada e progressão meiose (síntese e fosforilação de proteínas) não foram inibidos com a presença de ROS [33]. Além disso, de acordo com outros autores foi observado que a progressão meiótica foi acelerada em oócitos bovinos e suínos tratados com ROS [29, 30, 31, 34]. Esta cinética acelerada da meiose observada após presença de ROS pode ser devido à baixa sensibilidade de alguns eventos de inibição, além de serem independentes ao MPF.

Embora a ativação do MPF e da MAPK seja considerada como precursora essencial da retomada da meiose, outros caminhos podem desempenhar este papel na maturação dos oócitos. Eles incluem a quinase terminal Jun N (JNK), proteínas quinases ativadas por estresse (SAPKs) e a proteína quinase B (Akt/PKB), as quais pertencem a família de quinases evolutivamente conservadas. A JNK estava presente na maturação de oócitos de *Xenopus* e foi ativada imediatamente antes QVG. A Aurora-A quinase desempenha um papel durante a meiose de oócito *Xenopus* participando da cascata de fosforilações desencadeadas pela progesterona durante a maturação [33].

Existem relatos de que a inibição meiótica *in vitro* é capaz de induzir alterações ultraestruturais em oócitos bovinos, dependendo do fármaco e da concentração utilizada

[8]. Segundo Diez et al. [35], a parada meiótica antes da MIV de oócitos frescos não levou a alteração na estrutura do complexo *cumulus oophorus*, com expansão normal e ausência de alterações morfológicas nas organelas citoplasmáticas.

As principais modificações observadas durante a fase de desenvolvimento do oócito são formações das junções intercomunicantes entre o oócito e suas células somáticas circundantes; desenvolvimento e deslocamento do complexo de Golgi para a periferia do oócito; desenvolvimento do retículo endoplasmático liso e das gotas lipídicas; formação dos grânulos corticais e zona pelúcida; diferenciação da mitocôndria; quebra dos centríolos; transcrição e proteção dos mRNA maternos para a síntese de proteína do oócito, das células somáticas e do desenvolvimento embrionário precoce [36].

Com relação ao presente estudo, a partir da avaliação da ultraestrutura por microscopia eletrônica de transmissão (MET), foi possível observar que o grupo de oócitos avaliados imediatamente após a aspiração (grupo Imaturo - 0 hora) apresentou células da granulosa compactas e grânulos corticais localizados na região central do ooplasma, em forma de “clusters”. Estas características são sinais marcantes de imaturidade oocitárias [36], esperadas neste grupo. Além disso, foram observadas mitocôndrias e gotas lipídicas em grande número, assim como relatado por Auclair et al. [37]. Esse grupo de oócitos imaturos se caracterizou com um espaço perivitelínico maior que os demais grupos.

As células do *cumulus* possuem numerosas projeções, chamadas de projeções das células do *cumulus* (PCCs) as quais atravessam a zona pelúcida até chegarem ao oolema [38]. Basicamente existem dois tipos de junções que compõe as PCCs, as junções Gap que são encontradas entre as células da granulosa adjacentes e as junções intermediárias que estão entre as microvilosidades das células da granulosa e o oócito

[36]. No grupo de oócitos Imaturos foram observadas somente as junções intermediárias entre as microvilosidades, isto pode acontecer devido aos cortes obtidos no presente experimento.

A presença de RER (o que pode indicar uma maior produção de proteínas), mudanças nas formas das mitocôndrias indicando um aumento na sua fosforilação oxidativa [39] e a não condensação do material genético, o que sugere a continuidade da transcrição. Essas observações evidenciam uma melhora em alguns aspectos da organização e maturação do citoplasma e estas estruturas foram observadas em oócitos imaturos e maturados durante 6 horas.

Hyttel et al. [38] e Hyttel [36] descreveram que com o desenvolvimento oocitário, as mitocôndrias e os grânulos lipídicos se direcionam à periferia do oócito; entretanto, quando o oócito encontra-se num estado maduro, estas duas estruturas posicionam-se numa região mais central do ooplasma, enquanto que os grânulos corticais caminham para a periferia [36]. Essas observações também foram encontradas no grupo de oócitos maturados por 24 horas, tanto no grupo controle quanto aqueles que foram submetidos ao bloqueio, seguido da reversão da inibição oocitária (ROS, BL-I e ROS + BL-I).

No grupo Controle (6 horas), foi observada também a associação das mitocôndrias, gotas lipídicas e do retículo endoplasmático liso, formando a unidade metabólica [36, 40]. As PCCs ainda estavam presentes, em forma de junções intermediárias, entretanto atravessando a zona pelúcida e não se ligando mais ao oolema, mas retraindo suas projeções finais no espaço perivitelinico.

A presença de elevado número de gotículas lipídicas está associada às mitocôndrias e ao retículo endoplasmático liso, sendo denominadas unidades metabólicas [40, 41]. A associação desses elementos pode indicar a conversão de

hidratos de carbono e lipídios como fontes de energia para a síntese de ATP pelas mitocôndrias, necessário para a maturação do oócito edesenvolvimento posterior após a fertilização. Assim, a adequada capacidade de desenvolvimento dos oócitos pode correlacionar-se com a produção de ATP.

Os oócitos dos grupos ROS e BL-I antes da reversão da inibição apresentaram uma boa preservação do citoplasma, com morfologia semelhante aos grupos de oócitos imaturos. Os grânulos corticais apareceram em “cluster” no interior do citoplasma do oócito com tamanhos e eletrodensidades diferentes. Uma boa qualidade de grânulos de lipídios e mitocôndrias se apresentou distribuída por todo o citoplasma. As microvilosidades foram observadas na membrana vitelínica, indicando a presença de um citoesqueleto bem desenvolvido. Após a retirada do estímulo inibitório e maturação por 18 horas, a morfologia destes oócitos era bastante semelhante à de oócitos maduros descrita na literatura [32, 36, 38].

Por outro lado, os oócitos do grupo ROS + BL-I que foram bloqueados durante 6 horas, apresentaram uma morfologia que indicava uma alta metabolização de lipídio citoplasmático, representada pela visualização de figuras mielínica em abundância. Além disso, foi observada uma total ausência de microvilosidades indicando uma possível desestruturação do citoesqueleto e alteração do metabolismo oocitário. Fair et al. [32] relatam que a pré-maturação oocitária utilizando BL-I (100 μ M/40 h) foi prejudicial aos oócitos aspirados de folículos maiores que 3 mm. Ocorreu um alto grau de degeneração em até 50 % dos oócitos, os componentes do nucléolo apresentaram uma separação não fisiológica e os grânulos corticais se desintegraram.

No entanto, mesmo neste grupo, após a reversão do bloqueio, os oócitos apresentaram morfologia semelhante ao normal, o que significa que o efeito deletério da associação das drogas parece ter sido transitório.

5. Conclusão

Em conclusão, estes resultados demonstram que vários caminhos estão envolvidos na regulação da maturação meiótica oócitos bovinos. Alguns desses caminhos são independentes do MPF e, conseqüentemente, escapam do controle dos fármacos inibidores da CDK1, roscovitina e butirolactona I. Esta complexa regulação pode explicar o bloqueio parcial da meiose em oócitos tratados e observada após o tratamento.

As drogas utilizadas para bloqueio da meiose, da forma como utilizado no presente experimento, e quando utilizadas separadamente, não levaram a alterações estruturais dos oócitos.

Mais estudos sobre estas vias regulatórias são necessários para uma melhor compreensão da regulação da meiose e assim, alcançar sistemas de cultivo mais eficientes em manter os oócitos em VG.

Referências

- [1] Edwards RG. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey, and human ovarian oocytes. *Nature* 1965; 208: 349-51.
- [2] Kubelka M, Motlik J, Fulka J Jr, Prochazka R, Rimkevicova Z, Fulka J. Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. *Gam Res* 1988; 19: 423-31.
- [3] Damiani P, Fissore RA, Cibelli JB, Long CR, Balise JJ, Robl JM, Duby RT. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. *Mol Reprod Dev* 1996; 45(4): 521-34.

- [4] Cran DG, Esper CR. Cortical granules and the cortical reaction in mammals. *J Reprod Fertil Suppl* 1990; 42: 177-88.
- [5] Duque P, Diez C, Royo L, Lorenzo PL, Carneiro G, Hidalgo CO, Facal N, Gomez E. Enhancement of developmental capacity of meiotically inhibited bovine oocytes by retinoic acid. *Hum Reprod* 2002; 17: 2706-14.
- [6] Quetglas MD, Adona PR, de Bem THC, Pires PRL, Leal CLV. Effect of cyclin-dependent Kinase (CDK) inhibition on expression, localization and activity of maturation promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) in bovine oocytes. *Reprod Dom Anim* 201; 45: 1074-81.
- [7] Adona PR, Pires, PRL, Quetglas MD, Schwarz KRL, Leal CLV. Nuclear maturation kinetics and *in vitro* embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitina. *Anim Reprod Sci* 2008; 104: 389-97.
- [8] Faerge I, Mayes M, Hyttel P, Sirard MA. Nuclear ultrastructure in bovine oocytes after inhibition of meiosis by chemical and biological inhibitors. *Mol Reprod Dev* 2001; 59: 459-67.
- [9] Lonergan P, Faerge I, Hyttel PM, Boland M, Fair T. Ultrastructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest *in vitro* using roscovitine or butyrolactone. *Mol Reprod Dev* 2003; 64: 369-78.
- [10] Brunet S, Maro B. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte, integrating time and space. *Reproduction* 2005; 130: 801-11.
- [11] Sun QY, Wu GM, Lai LX, Bonk A, Cabot R, Park KW. Regulation of mitogen activated protein kinase phosphorylation, microtubule organization, chromatin behavior, and cell cycle progression by protein phosphatases during pig oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Biol Reprod* 2002; 66: 580-8.

- [12] Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB, Wolf E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biol Reprod* 2001; 64: 904-9.
- [13] Brevini TA, Cillo F, Antonini S, Gandolfi F. Effects of endocrine disrupters on the oocytes and embryos of farm animals. *Reprod Domest Anim* 2005; 40(4):291-9.
- [14] Kim NH, Cho SK, Choi SH, Kim EY, Park SP, Lim JH. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes *in vitro* maturation. *Zygote* 2000; 8: 25-32.
- [15] Brevini TAL, Cillo F, Antonini A, Gandolfi F. Cytoplasmic remodeling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. *Anim Reprod Sci* 2007; 98: 23-38.
- [16] Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 2009; 71:836-48.
- [17] Sirard MA, First NL. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol Reprod* 1988; 39:229-234.
- [18] Hashimoto S, Minami N, Takaura R, Imai H. Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest *in vitro*. *Biol Reprod* 2002; 66: 1696-701.
- [19] Nogueira D, Ron-El R, Friedler S. Meiotic arrest *in vitro* by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. *Biol Reprod* 2006; 74: 177-84.

- [20] Egan E, Solomon MJ. Cyclin-stimulated binding of cks proteins to cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biology* 1998; 18: 3659-67.
- [21] Kubelka M, Motlik J, Schultz RM, Pavlok A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation. *Biol Reprod* 2000; 62:292-302.
- [22] Fissore RA, He CL, Vande Woude GF. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiotic resumption in bovine oocytes. *Biol Reprod* 1996; 55:1261-70.
- [23] Gottardi FP, Mingoti GZ. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. *Rev Brasil Reprod Anim* 2009; 33: 82-94.
- [24] Mitra J, Schultz RM. Regulation of the acquisition of meiotic competence in the mouse: changes in the subcellular localization of cdc2, cyclin B1, cdc25C and wee1, and in the concentration of these proteins and their transcripts. *J Cell Sci* 1996; 109: 2407-15.
- [25] Robert C, Hue I, McGraw S, Gagne D, Sirard MA. Quantification of cyclin b1 and p34cdc2 in bovine cumulus-oocyte complexes and expression mapping of genes involved in the cell cycle by complementary DNA macroarrays. *Biol Reprod* 2002; 67: 1456-64.
- [26] Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 2012; 66, 105-43.
- [27] Motlik J, Pavlok A, Kubelka M, Kalous J, Kalab P. Interplay between cdc2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology* 1998; 49:461-9.

- [28] Imai K, Kobayashi S, Kaneyama K, Kojima T, Nagai T, 2002: Effects of butyrolactone-I on GVBD in bovine oocytes and subsequent maturation, fertilization and development *in vitro*. J Reprod Devel **48**, 249-255.
- [29] Mermillod P, Tomanek M, Marchal R, Meijer L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF Kinase Activity. Mol Reprod Dev 2000; 55: 89-95.
- [30] Ponderato N, Lagutina I, Crotti G, Turini P, Galli C, Lazzari G. Bovine oocytes treated prior to *in vitro* maturation with a combination of butyrolactone I and roscovitine at low doses maintain a normal developmental capacity. Mol Reprod Dev 2001; 60: 579-85.
- [31] Vigneron C, Nuttinck F, Perreau C, Reinaud P, Charpigny G, Mermillod P. Effect of roscovitine, a cdk1 inhibitor, and of the presence of oocyte on bovine cumulus cell expansion and cyclooxygenase-2 expression. Mol Reprod Dev 2003; 65(1): 114-21.
- [32] Fair T, Hyttel P, Motlik J, Boland M, Lonergan P. Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes *in vitro* using butyrolactone I: effects on oocyte ultrastructure and nucleolus function. Mol Reprod Dev 2002; 62: 375-86.
- [33] Vigneron C, Perreau C, Dalbie`S-Tran R, Joly C, Humblot P, Uzbekova S, Mermillod P. Protein synthesis and mRNA storage in cattle oocytes maintained under meiotic block by roscovitine inhibition of mpf activity. Mol Reprod Dev 2004; 69: 457-65.
- [34] Marchal R, Tomanek M, Terqui M, Mermillod P. Effects of cell cycle dependent kinases inhibitor on nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes. Mol Reprod Dev 2001; 60(1): 65-73.
- [35] Diez C, Duque P, Gomez H, Hidalgo CO, Tamargo C, Rodriguez A, Fernandez L, de la Varga S, Fernandez A, Facal N, Carbajo M. Bovine oocyte vitrification before or

after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. *Theriogenology* 2005; 64:317-33.

[36] Hyttel P. Oocyte maturation and fertilization: a long history for a short event. *Cap I: Electron microscopy of mammalian oocyte development, maturation and fertilization* 2011; 1-37.

[37] Auclair S, Uzbekov R, Elis S, Sanchez L, Kireev I, Lardic L, Dalbies-Tran R, Uzbekova S. Absence of cumulus cells during *in vitro* maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 67: E599-E613.

[38] Hyttel P, Xu KP, Smith S, Greve T. Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in cattle. *J Reprod Fertil* 1986; 78: 615-25.

[39] Bereiter-Hahn J, Voth M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* 1994; 27:198-219.

[40] Kruip TAM, Cran DG, Van Beneden TH, Dieleman SJ. Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. *Gamete Res* 1983;8: 29-47.

[41] Nagano M, Takahashi Y. Relationship between bovine oocyte morphology and *in vitro* developmental potential. *Zygote* 2006; 14: 53-61.

Capítulo 5

Conclusões Gerais

Experimento I:

1- Nas condições do presente experimento o uso de 25 μM de ROS e 100 μM de BL-I durante 24 horas induziu altos índices de degeneração oocitária.

2- A diminuição da concentração ROS para 12,5 μM , BL-I 50 μM e de sua associação para ROS (6,25 μM) + BL-I (25 μM) por 12 horas de incubação reduziu o índice de degeneração oocitária mantendo os oócitos em QVG logo após a aspiração folicular e permitindo uma boa quantidade de oócitos em MII após reversão do bloqueio meiótico.

3- As drogas indutoras do bloqueio meiótico, nas mesmas concentrações, por apenas 6 horas, com reversão por 18 horas, permitiu altos índices de maturação meiótica e produção embrionária semelhante a obtida no grupo controle representando uma boa alternativa para sincronização da maturação e otimização do uso de sêmen de alto valor.

Experimento II:

1- A inibição meiótica com ROS (12,5 μM) por 6 horas e reversão por 18 horas levou a taxas de formação de blastocistos inferiores ao grupo controle, tanto nos dias 6 como 7.

2- A inibição meiótica com BL-I (50 μM) e ROS 6,25 μM + BL-I 25 μM levou a taxas de formação de blastocistos superiores ao grupo controle (D6 e D7).

3- Embriões produzidos *in vitro*, após inibição meiótica com BL-I e ROS + BL-I apresentaram maiores números totais de células íntegras em relação ao grupo controle e o grupo ROS e menor número de ocorrência de apoptose em embriões dos grupos BI-I e ROS + BL-I.

4- O processo de criopreservação elevou o número de células apoptóticas em todos os grupos, entretanto embriões dos grupos controle e ROS apresentaram maiores números de células em apoptose em relação aos demais grupos.

5- Embriões do grupo ROS + BL-I apresentaram maior taxa de sobrevivência dos blastocistos após a vitrificação pela elevada taxa de reexpansão comparada aos demais grupos.

Experimento III

1- Não foi observada alteração na ultraestrutura e localização das organelas de oócitos dos grupos controle, ROS 12,5 μ M e BL-I 50 μ M inibidos por 6 horas ou após a reversão por 18 horas e MIV.

2- O tratamento com ROS 6,25 μ M + BL-I 25 μ M induziu alterações ultraestruturais nos oócitos, mas estas foram revertidas durante a retirada do bloqueio meiótico.

3- O bloqueio da meiose de oócitos bovinos com os inibidores de CDK ROS, BL-I e a associação de ROS + BL-I alterou a expressão das proteínas ERK 1/2, p 34^{cdc}², ciclina B1.

4- O bloqueio da meiose de oócitos bovinos com os inibidores de CDK ROS, BL-I e a associação de ROS + BL-I não interferiu na localização das proteínas ERK 1/2, p 34^{cdc}², ciclina B1.

Referências

- ADDINALL, S.G.; MAYR, P.S.; DOYLE, S.; SHEEHAN, J.K.; WOODMAN, P.G.; ALLAN, V.J. Phosphorylation by cdc2-cyclin B1 kinase releases cytoplasmic dynein from membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 15939–15944, 2001.
- ADONA, P.R.; LEAL, C.L.V. Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. **Zygote**, v. 12, p. 197–204, 2004.
- ADONA, P.R.; PIRES, P.R.L.; QUETGLAS, M.D.; SCHWARZ, K.R.L.; LEAL, C.L.V. Nuclear maturation kinetics and *in vitro* embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitina. **Animal Reproduction Science**, p. 389–397, v. 104, 2008.
- AKTAS, H.; WHEELER, M.B.; FIRST, N.L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. Maintenance of meiotic arrest by increasing [cAMP]_i may have physiological relevance in bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 105, p. 237-245, 1995.
- EVERY, B.; FAERGE, I.; HOLM, P. Confocal Microscopy of bovine oocytes and Roscovitine treated abattoir oocytes with emphasis on Mitochondria distribution and nuclear stage. **Theriogenology**, v.57, p.711, 2002.
- BAGG, M.A.; NOTTLE, M.B.; GRUPEN, C.G.; ARMSTRONG, D.T. Effect of dibutyryl cAMP on the cAMP content, meiotic progression, and developmental potential of *in vitro* matured pre-pubertal and adult pig oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 1326-1332, 2006.
- BARIL, G., TRALDI, A-L., COGNIÉ, Y., LÉBOEUF, B., et al. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. **Theriogenology**, v.56, p.299-305, 2001.
- BARRETTO, L.S.S.; CAIADO CASTRO, V.S.D.; GARCIA, J.M.; MINGOTI, G.Z. Role of roscovitine and IBMX on kinetics of nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 202–207, 2007.
- BILLIG, H.; THELANDER, H.; ROSBERG, S. Adenosine receptor-mediated effects by nonmetabolizable adenosine analogs in preovulatory rat granulosa cells: a putative local regulatory role of adenosine in the ovary. **Endocrinology**, v. 122(1), p. 52-61, 1988.
- BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of culture media and energy sources on the inhibition of nuclear maturation in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 66, p. 297–306, 2006.

- BILODEAU-GOESEELS, S. Bovine oocyte meiotic inhibition before *in vitro* maturation and its value to *in vitro* embryo production: does it improve developmental competence? **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.687-693, 2012.
- BLODIN, P.; GUILBAULT, L.A.; SIRARD, M.A. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. **Theriogenology**, 1997Oct 1;v. 48(5), p. 803-813, 1997.
- BOATRRIGHT, K.M.; SALVESEN, G.S. Mechanisms of caspase activation. *Current opinion in cell biology*, v. 15, p. 725-731, 2003.
- BRANIGAN, E.F.; ESTES, A. Use of micro-dose human chorionic gonadotropin (hCG) after clomiphene citrate (CC) to complete folliculogenesis in previous CC-resistant anovulation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 192, p. 1890–1894, 2005.
- BREVINI, T.A.L.; CILLO, F.; ANTONINI, A.; GANDOLFI, F. Cytoplasmic remodeling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 23–38, 2007.
- BRUNET, S., MARO, B. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte, integrating time and space. **Reproduction**, v. 130, p. 801–811, 2005.
- CAMPOS-CHILLÓN, L.F.; WALKER, D.J.; DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F.; SEIDEL, Jr., G.E. *In vitro* assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. **Theriogenology**, v.65, p.1200–1214, 2006.
- CARABATSOS, M.J.; SELLITTO, C.; GOODENOUGH, D.A.; ALBERTINI, D.F. Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. **Developmental Biology**, v. 226, p. 167-179, 2000.
- CEKLENIK, N.A.; COMBELLES, C.M.; GANZ, D.A.; FUNG, J.; ALBERTINI, D.F.; RACOWSKY, C. A novel system for *in vitro* maturation of human oocytes. **Fertility and Sterility**, v. 75, p. 1185–1193, 2001.
- CHA, K.Y.; HAN, S.Y.; CHUNG, H.M.; CHOI, D.H.; LIM, J.M.; LEE, W.S.; KO, J.J.; YOON, T.K. Pregnancies and deliveries after *in vitro* maturation culture followed by *in vitro* fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 73, p. 978-983, 2000.

- CONTI, M.; ANDERSEN, C.B.; RICHARD, F.; MEHATS, C.; CHUN, S.Y.; HORNER, K.; JIN, C.; TSAFRIRI, A. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, p. 153–159, 2002.
- COY, P.; ROMAR, R.; PAYTON, R.R.; MCCANN, L.; SAXTON, A.M.; EDWARDS, J.L. Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the S-enantiomer of roscovitine, effects on maturation, fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. **Reproduction**, v. 129, p. 19–26, 2005a.
- COY, P.; ROMAR, R.; RUIZ, S.; C'ANOVAS, S.; GADEA, J.; V'AZQUEZ, F.G.; MAT'AS, C. Birth of piglets after transferring of *in vitro*-produced embryos pre-matured with R-roscovitine. **Reproduction**, v. 129, p. 747–755, 2005b.
- CRAN, D.G.; ESPER, C.R. Cortical granules and the cortical reaction in mammals. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 42, p. 177-188, 1990.
- DATTENA, M. et al. Survival and viability of vitrified *in vitro* and *in vivo* produced ovine blastocysts. **Theriogenology**, v.53, p.1511-1519, 2000
- DE LA FUENTE, R.; KING, W.A. Use of a chemically defined system for the direct comparison of inner cell mass and trophectoderm distribution in murine, porcine and bovine embryos. **Zygote**, v. 5, p.309-320, 1997.
- DESHMUKH, M.; KUIDA, K.; JOHNSON, E.M.J. Caspase inhibition extends the commitment of neuronal death beyond cytochrome c release to the point of mitochondrial depolarization. **The Journal of Cell Biology**, v. 150, p. 131-143, 2000.
- EDWARDS, R.G. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey, and human ovarian oocytes. **Nature**, v. 208, p. 349-351, 1965.
- ELLIS, H.M.; HORVITZ, H.R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. **Cell**, v. 44, p.817-829, 1986.
- EPPIG, J.J. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. **BioEssays**, v. 13, p. 569–574, 1991a.
- FAERGE, I.; MAYES, M.; HYTTEL, P.; SIRARD, M.A. Nuclear ultrastructure in bovine oocytes after inhibition of meiosis by chemical and biological inhibitors. **Molecular Reproduction and Development**, v. 59, p. 459–467, 2001.
- FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; COTTELL, D.C.; HYTTEL, P.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. **Molecular Reproduction and Development**, v.58, p.186-195, 2001.

- FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v.71, p.836-848, 2009a.
- FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I reversibly arrests meiosis without increasing meiotic abnormalities after in vitro maturation. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 145, p. 76–80, 2009b.
- FIMIA, G.M.; SASSONE CORSI, P. Cyclic AMP signalling. **Journal of Cellular Science**, v. 114, p. 1971-1972, 2001.
- FUNAHASHI, H.; CANTLEY, T.C.; DAY, B.N. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following in vitro fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 49-53, 1997.
- GILCHRIST, R. B. Interações oócitos-células do *cumulus* regulando a qualidade do oócito. **Acta Scientiae Veterinariae**, 36(Supl. 2): s257-s278, 2008.
- GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v. 67, p. 6–15, 2007.
- GOLDSTEIN, J.C.; WATERHOUSE, N.J.; JUIN, P.; EVAN, G.I.; GREEN, D.R. The coordinate release of cytochrome c is rapid, complete and kinetically invariant. **Nature Cell Biology**, v. 2, p.156-162, 2000.
- GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, p.82-94, 2009.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, p. 335-343, 2007.
- GRUPEN, C.G.; FUNG, M.; ARMSTRONG, D.T. Effects of milrinone and butyrolactone-I on porcine oocyte meiotic progression and developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18(3), p. 309-317, 2006.
- HARDY, K. Apoptosis in the human embryo. **Reviews of Reproduction**, v.4, p.125-134, 1999.

- HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; TAKAURA, R.; IMAI, H. Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1696-1701, 2002.
- HASLER, J.F. The current status and the future of the commercial embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 15, p. 245-264, 2003.
- HENDRICKS, K.E.; HANSEN, P.J. Can programmed cell death be induced in post-ejaculatory bull and stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 71 (7), p. 1138-1146, 2009.
- HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.
- HENGARTNER, M.O.; HORTVITZ, H.R.C. *Elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. **Cell**, v. 76, p. 665- 676, 1994.
- HORVITZ, H.R.; ELLIS, H.M.; STERNBERG, P. Programmed cell death in nematode development. **Neuroscience Commentaries**, v. 1, p.56-65, 1982.
- HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote**, v. 5, p. 371-376, 1997.
- HUANG, F.J.; CHANG, S.Y.; TSAI, M.Y.; LIN, Y.C.; KUNG, F.T.; WU, J.F.; LU, Y.J. Relationship of the human cumulus-free oocyte maturational profile with *in vitro* outcome parameters after intracytoplasmic sperm injection. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 16, p. 483-487, p. 1999.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLENSSEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23–32, 1997.
- HYTTEL, P.; XU, K.P.; SMITH, S.; GREVE, T. Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, p. 615–625, 1986.
- IMAI, K.; KOBAYASHI, S.; KANEYAMA, K.; KOJIMA, T.; NAGAI, T. Effects of butyrolactone-I on GVBD in bovine oocytes and subsequent maturation, fertilization and development *in vitro*. **Journal of Reproduction and Development**, v. 48, p. 249-255, 2002.
- JAMNONGJIT, M.; HAMMES, S.R. Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 23, p.234-241, 2005.
- JANSSENSWILLEN, C.; NAGY, Z.P.; VAN STEIRTEGHEM, A. Maturation of human cumulus-free germinal vesicle-stage oocytes to metaphase II by coculture with monolayer Vero cells. **Human Reproduction**, v. 10, p. 375-378, 1995.

- JIMENEZ-MACEDO, A.R.; IZQUIERDO, D.; URDANETA, A.; ANGUITA, B.; PARAMIO, M.T. Effect of roscovitine on nuclear maturation, MPF and MAP kinase activity and embryo development of prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, v. 65, p. 1769-1782, 2006.
- JU, J.C.; TSAY, C.; RUAN, C.W. Alterations and reversibility in the chromatin, cytoskeleton and development of pig oocytes treated with roscovitine. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64, p. 482–491, 2003.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427p.
- KIM, N.H.; CHO, S.K.; CHOI, S.H.; KIM, E.Y.; PARK, S.P.; LIM, J.H. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes *in vitro* maturation. **Zygote**, v. 8, p. 25–32, 2000.
- KING, W.A.; SUPPLIZI, A.V.; DIOP, H.E.P. Chromosomal analysis of embryos produced by artificially inseminated superovulated cattle. **Genetics Selection Evolution**, v. 27, p. 189–194, 1995.
- KLINE, J.T.; KLINE, D. Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: evidence from inositol trisphosphate-induced calcium release, but not calcium-induced calcium release. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 193-203, 1994.
- KOTSUJI, F.; KUBO, M.; TOMINAGA, T. Effect of interactions between granulosa and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 151–156, 1994.
- KRISHER, R.L.; BAVISTER, B.D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v. 59, p. 103–114, 1998.
- KRUIP, T.A.M.; CRAN, D.G.; VAN BENEDEN, T.H.; DIELEMAN, S.J. Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. **Gamete Research**, v. 8, p. 29-47, 1983.
- KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R.M.; PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 292-302, 2000.
- KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. **Theriogenology**, v.67, p.73-80, 2007.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

- LAGUTINA, I.; PONDERATO, N.; LAZZARI, G.; GALLI C. Kinetics of oocyte maturation and subsequent development of ivf, parthenogenetic, and nt bovine embryos after meiotic inhibition with roscovitina. **Cloning Stem Cells**, v. 4: p. 113-119, 2002.
- LANGER, P.R.; WALDROP, A.A.; WARD, D.C. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, p. 6633-6637, 1981.
- LEFEBVRE, C.; TERRET, M.E.; DJIANE, A.; RASSINIER, P.; MARO, B.; VERLHAC, M.H. Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. **Journal of Cellular Biology**, v.157, p.603-613, 2002.
- LIANG, C.G.; HUO, L.J.; ZHONG, Z.S.; CHEN, D.Y.; SCHATTEN, H.; SUN, Q.Y. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent activation of mitogen-activated protein kinase in cumulus cells is essential for germinal vesicle breakdown of porcine cumulus-enclosed oocytes. **Endocrinology**, v. 146(10), p. 4437-4444, 2005.
- LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; ROBERTS, T.H.; HIRSHBERG, K. Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, p. 557-589, 2000.
- LIU, L.; TRIMARCHI, J.R.; KEEFE, D.L. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1745-1753, 2000.
- LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; YANG, X.; BOLAND, M. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, p. 204-209, 2000.
- LONERGAN, P.; FAERGE, I.; HYTTEL, P.M.; BOLAND, M.; FAIR, T. Ultrastructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest *in vitro* using roscovitine or butyrolactone. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64, p. 369-378, 2003.
- LONERGAN, P.; KHATIR, H.; CAROLAN, C.; MERMILLOD, P. Bovine blastocyst production *in vitro* after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, p. 355-365, 1997.
- LONG, C.R. Eclosão assistida a laser em embriões bovinos produzidos *in vitro* para melhorar os índices de prenhez. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 36 (2), p. 311-318, 2008.

- LUCIANO, A.M.; MODINA, S.; VASSENA, R.; MILANESI, E.; LAURIA, A.; GANDOLFI, F. Role of intracellular cyclic adenosine 30,50-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during *in vitro* maturation of bovine oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 465-472, 2004.
- MARTIN, S.J.; REUTELINGSPERGER, C.P.M.; MCGAHON, A.J.; RADER, J.A.; VAN SCHIE, R.C.A.A.; LAFACE, D.M.; GREEN, D.R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 182, p.1545-1556, 1995.
- MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of Reproduction**, v.54,p.1059-1069, 1996.
- MEIRELLES, F.V.; CAETANO, A.R.; WATANABE, Y.F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S.F.; MERIGHE, G.K. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 3-20, 2004.
- MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF Kinase Activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 89-95, 2000.
- MOTLIK, J.; PAVLOK, A.; KUBELKA, M.; KALOUS, J.; KALAB, P. Interplay between cdc2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. **Theriogenology**, v. 49, p. 461-469, 1998.
- MORENO, R.D.; SCHATTEN, G.; RAMALHO-SANTOS, J. Golgi apparatus dynamics during mouse oocyte *in vitro* maturation: effect of the membrane trafficking inhibitor brefeldin A. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1259-1266, 2002.
- NAKAMURA, N.; TOKUMOTO, T.; UENO, S.; IWAO, Y. The cytoskeleton-dependent localization of cdc2/cyclin B in blastomere cortex during *Xenopus* embryonic cell cycle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, p. 336–345, 2005.
- NOGUEIRA, D.; ALBANO, C.; ADRIAENSSENS, T.; CORTVRINDT, R.; BOURGAIN, C.; DEVROEY, P.; SMITZ J. Human oocytes reversibly arrested in prophase I by phosphodiesterase type 3 inhibitor *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1042-1052, 2003b.

- NOGUEIRA, D.; CORTVRINDT, R.; DE MATOS, D.G.; VANHOUTTE, L.; SMITZ, J. Effect of phosphodiesterase type 3 inhibitor on developmental competence of immature mouse oocytes in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 2045-2052, 2003a.
- NOGUEIRA, D.; RON-EL, R.; FRIEDLER, S. Meiotic arrest in vitro by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. **Biology of Reproduction**, v.74, p. 177-184, 2006.
- OH, B.; HAMPL, A.; EPPIG, J.J.; SOLTER, D.; KNOWLES, B.; SPIN. A substrate in the MAP kinase pathway in mouse oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 50, p.240-249, 1998.
- OKADA, A.; YOSHII, K.; MIZUOCHI, Y.; ANDOH, T.; JOUJOU, S.; WACHI, S.;TAGAWA, M.; ISHIDA, N.; ASADA, M.; FUKUI, Y. Viability of cryopreserved and vitrified embryos and fertility after direct transfer in ewes. **Journal of Reproduction and Development**, v.48, p.189-195, 2002.
- PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. **Biotechnology Advances**, v. 14(2), p. 127-149, 1996.
- PAPAPETROPOULOS, A.; ABOU-MOHAMED, G.; MARCZIN, N.; MURAD, F.; CALDWELL, R.W.; CATRAVAS, J.D. Downregulation of nitrovasodilator-induced cyclic GMP accumulation in cells exposed to endotoxin or interleukin-1 beta. **British Journal of Pharmacology**, v. 118(6), p. 1359-1366, 1996.
- PARONE, P.A.; JAMES, D.; MARTINOU, J.C. Mitochondria: regulating the inevitable. **Biochimie**, v.84, p.105-111, 2002.
- PATTERSON, S.; SPAHR, C.S.; DAUGAS, E.; SUSIN, S.A.; Irinopoulos, T.; Koehler, C.; Kroemer, G. Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. **Cell Death and Differentiation**, v. 7, p. 137-144, 2000.
- PAVLOK, A.; KANKA, J.; MOTLIK, P.; VODICKA, P. Culture of bovine oocytes from small antral follicles in meiosis-inhibiting medium with butyrolactone I: RNA synthesis, nucleolar morphology and meiotic competence. **Animal Reproduction Science**, v. 64, p. 1-11, 2000.
- PONDERATO, N.; CROTTI, G.; TURINI, P.; DUCHI, R.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Embryonic and foetal development of bovine oocytes treated with a combination of

butyrolactone I and roscovitine in an enriched medium prior to IVM and IVF. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, p. 513–518, 2002.

PONDERATO, N.; LAGUTINA, I.; CROTTI, G.; TURINI, P.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Bovine oocytes treated prior to *in vitro* maturation with a combination of butyrolactone I and roscovitine at low doses maintain a normal developmental capacity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, p. 579–585, 2001.

PUGH, P.A.; TERVIT, H.R.; NIEMANN, H. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos following in straw-dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. **Animal Reproduction Science**, v.58, p.9-22, 2000.

QUETGLAS, M.D.; ADONA, P.R.; de BEM, T.H.C.; PIRES, P.R.L.; LEAL, C.L.V. Effect of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibition on expression, localization and activity of maturation promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) in bovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 45, p.1074–1081, 2010.

RACOWSKY, C. Effect of forskolin on the spontaneous maturation and cyclic AMP content of rat oocyte-cumulus complexes. **Journal Reproduction and Fertility**, v.72, p.107-116, 1984.

RALL, W.F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v.24, p.387-402, 1987.

RIZOS, D.; GUITIÉRREZ-ADÁN, A.; PÉREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and Messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, v.68, p.236-243, 2003.

RIOS, G.L.; MUCCI, N.C.; KAISER, G.G.; ALBERIO, R.H. Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.19-24, 2010.

ROSKOSKI JR, R. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. **Pharmacological Research**, v. 66, p. 105-143, 2012.

ROBERT, C.; HUE, I.; MCGRAW, S.; GAGNE, D.; SIRARD, M.A. Quantification of Cyclin B1 and p34cdc2 in Bovine Cumulus-Oocyte Complexes and Expression Mapping of Genes Involved in the Cell Cycle by Complementary DNA Macroarrays. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1456-1464, 2002.

- SANANMUANG, T.; TECHAKUMPHU, M.; THARASANIT, T. The effects of roscovitina on cumulus cell apoptosis and the developmental competence of domestic cat oocytes. **Theriogenology**, v. 73 (2), p. 199-207, 2010.
- SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v. 141 (1), p. 1-19, 2011.
- SANDRI, L.R. **Efeito de bloqueadores meióticos na maturação e ultraestrutura de oócitos e sua consequência na produção de embriões *in vitro***. Dissertação (Mestrado), 2007, Universidade Federal de Santa Maria.
- SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slowfreezing and vitrification. **Reproduction**, v. 141, p. 1-19, 2011.
- SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, v. 45, p. 528-537, 2000.
- SELA-ABRAMOVICH, S.; EDRY, I.; GALIANI, D.; NEVO, N.; DEKEL, N. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. **Endocrinology**, v. 147, p. 2280-2286, 2006.
- SHARMA, K.; WANG, R.X.; ZHANG, L.Y.; YIN, D.L.; LUO, X.Y.; SOLOMON, J.C.; JIANG, R.F.; MARKOS, K.; DAVIDSON, W.; SCOTT, D.W.; SHI, Y.F. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. **Pharmacology & Therapeutics**, v.88, p.333-347, 2000.
- SHU, Y.M.; ZENG, H.T.; REN, Z; ZHUANG, G.L.; LIANG, X.Y.; SHEN, H.W.; YAO, S.Z.; KE, P.Q.; WANG, N.N.. Effects of cilostamide and forskolin on the meiotic resumption and embryonic development of immature human oocytes. **Human Reproduction**, v. 23 (3), p. 504–513, 2008.
- SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55(6), p. 1241-1254, 2001.
- SIRARD, M.A.; COENEN, K. Meiotic resumption is prevented by mousine in bovine immature oocytes. **Theriogenology**, v. 47, p. 201, 1994.
- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v. 49, p. 483-497, 1998.
- SLIMANE, W.; KING, W.A. Chromosomal abnormalities: a potential quality issue for cloned cattle embryos. **Cloning Stem Cells**, v. 4, p. 319–329, 2002.
- SMITH, S.D.; MIKKELSEN, A.; LINDENBERG, S. Development of human oocytes matured in vitro for 28 or 36 hours. **Fertility and Sterility**, v. 73, p. 541-544, 2000.

- SOMMERFELD, V.; NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. **Cryobiology**, v.38, p.95-105, 1999.
- STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; SOTOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P.B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation, correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 904–909, 2001.
- STRICKER, S.A. Structural reorganization of the endoplasmic reticulum during egg maturation and fertilization. **Seminars Cellular and Developmental Biology**, v. 17, p. 303-313, 2006.
- SUN, Q.Y.; WU, G.M.; LAI, L.X.; BONK, A.; CABOT, R.; PARK, K.W. Regulation of mitogen activated protein kinase phosphorylation, microtubule organization, chromatin behavior, and cell cycle progression by protein phosphatases during pig oocyte maturation and fertilization in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 66, p.580-588, 2002.
- SCHWARZ, K.R.;PIRES, P.R.;ADONA, P.R.;CÂMARA DE BEM, T.H.;LEAL, C.L. Influence of nitric oxide during maturation on bovine oocyte meiosis and embryo development in vitro. **Reproduction Fertility and Development**, v. 20, p. 529-536, 2008.
- TOMEK, W.; TORNER, H.; KANITZ, W. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, p.86-91, 2002.
- TRIPATHI, A.;PREM KUMAR, K.V.; CHAUBE, S.K. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. **Journal of Cellular Physiology**, v. 223, p. 592–600, 2010.
- UCAR, H.; TACHIBANA, K.; KISHIMOTO, T. The Mos-MAPK pathway regulates Diaphanous-related formin activity to drive cleavage furrow closure during polar body extrusion in starfish oocytes. **Journal of Cell Science**, v. 126, p. 5153-5165, 2013.
- VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v. 65, p. 236-244, 2006.
- VAN BLERKOM, J. Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. **Proceedings National Academy of Sciences USA**, v.88, p.5031-5035, 1991.
- VELILLA, E.; IZQUIERDO, D.; RODRIGUEZ-GONZALEZ, E.; LOPEZ-BEJAR, M.; VIDAL, F.; PARAMIO, M.T. Distribution of prepubertal and adult goat oocyte cortical

granules during meiotic maturation and fertilization, ultrastructural and cytochemical study. **Molecular Reproduction and Development**, v. 68, p. 507–514, 2004.

VIGNERON, C.; PERREAU, C.; DUPONT, J.; UZBEKOVA, S.; PRINGENT, C.; MERMILLOD, P. Several signaling pathways are involved in the control of cattle oocyte maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 69, p. 466-474, 2004.

VIUFF, D., HENDRIKSEN, P.J., VOS, P.L. Chromosomal abnormalities and developmental kinetics in *in vivo* developed cattle embryos at days 2 to 5 after ovulation. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 204–208, 2001.

WESSEL, G.M.; CONNER, S.D.; BERG, L. Cortical granule translocation is microfilament mediated and linked to meiotic maturation in the sea urchin oocyte. **Development**, v. 126, p. 4315–4325, 2002.

WILDING, M.; DALE, B.; MARINO, M.; DI MATTEO, L.; ALVIGGI, C.; PISATURO, M.L.; LOMBARDI, L.; DE PL'ACIDO, G. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. **Human Reproduction**, v. 16, p. 909–917, 2001.

WU, C.; RUI, R.; DAÍ, J.; ZHANG, C.; JU, S.; XIE, B.; LU, X.; ZHENG, X. Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocyte. **Molecular and Reproductive Development**, v. 73 (11), p. 1454-1462, 2006.

WYLLIE, A.H. Apoptosis: an overview. **British Medical Bulletin**, v. 53, p.451-465, 1997.

WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.R.; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **Internation Review of Cytology**, v. 68, p. 251-306, 1980.

XIANG,WU, D.; CHEUNG, Q.C.; WEN, L.; LI, J. A growth-maturation system that enhances the meiotic and developmental competence of porcine oocytes isolated from small follicles. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 547-554, 2006.

WU, G.M.; SUN, Q.Y.; MAO, J.; LAI, L.; PARK, K.W.; PRATHER, R.S.; DIDION, B.A.; DAY, B.N. High developmental competence of pig oocytes after meiotic inhibition with a specific M-phase promoting factor kinase inhibitor, butyrolactone I. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 170–177, 2002.

YAVIN, S.; AROYO, A.; ARAV, A. Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. **Human Reproduction**, v .24, p. 797-804, 2009.

ZIJNO, A.; LEOPARDI, P.; MARCON, F.; CREBELLI, R. Sex chromosome loss and non-disjunction in women: analysis of chromosomal segregation in binucleated lymphocytes. **Chromosoma**, v. 104, p. 461-467, 1996.

Anexo

Normas para publicação na *Reproduction in Domestic Animals*

ISSN: 1439-0531

1. General

Reproduction in Domestic Animals is an international journal publishing original, significant articles on reproduction in domestic animals, laboratory animals, and wildlife, with particular attention to basic, applied and clinical research. *Reproduction* is considered in a broad context, with its strong disciplinary, comparative core. The journal therefore covers obstetrics, neonatology and udder health, and welcomes contributions in these areas. The scope of the journal applies to veterinarians, breeders, and biologists while also being of interest to practitioners of human medicine. *Reproduction in Domestic Animals* is the official organ of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR), and the Spanish Society of Animal Reproduction (AERA).

We encourage the submission of topical results for publication as original papers, reviews (mini-reviews or critical feature articles), or short communications (including case reports and technical notes). Note that *Reproduction in Domestic Animals* only publishes well-written papers of high scientific quality and significance for the advancement of the field of reproduction, despite they being scientifically sound or properly executed or written. Feature articles or reviews should overview known information or tackle controversial issues in a particular area of the above-mentioned fields that comprise the scope of the journal, with the aim of founding future innovative research. Letters to the Editor, viewpoint articles and comments on published papers are also welcomed. Comments should be confined to the substance of the paper and the authors of the paper referred to will be offered the opportunity to respond. The journal publishes ONLINE-only preliminary communications of results that are of current and extreme interest. Authors interested in preparing a review, a feature article, or a viewpoint article, are invited to discuss the matter with the Editor-in-Chief. Such preliminary contact with the Editor-in-Chief is also advisable when Patent-related matters are included in any manuscript. All papers are subjected to a thorough peer-

review by at least two ad-hoc peer referees. Short communications will be subject to accelerated, but very strict refereeing. The publication language is English.

Short communications will be subject to accelerated, but very strict refereeing. Short Communications are available online only under its respective volume and issue at www.wileyonlinelibrary.com/journal/rda. The quality of articles and the standards for publication remain the same whether papers are published both print and online, or online-only.

The publication language is English.

2. Manuscript submission

The submission and review process of *Reproduction in Domestic Animals* is solely handled online at <http://mc.manuscriptcentral.com/rda>. To submit an article to *Reproduction in Domestic Animals*, please go to <http://mc.manuscriptcentral.com/rda>, create an account and submit your article. Complete instructions on how to submit a paper are available online at the Journal website [wileyonlinelibrary.com/journal/rda](http://www.wileyonlinelibrary.com/journal/rda). Please note that it is compulsory to include include all authors with their affiliation and valid email addresses.

Please see that the corresponding author's complete address and a valid email are also present in the manuscript.

2.1. Licence to publish

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreement (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright-License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

2.2. Authorship and Acknowledgements

Authorship: Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript has been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

Reproduction in Domestic Animals adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE, authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

Upon submission of the manuscript, it is required that all authors be accredited as appropriate. During the online submission process, the corresponding author will be asked to submit a short description of each individual's contribution to the research and its publication. Upon submission of a manuscript all co-authors must also be registered with correct e-mail addresses. If any of the e-mail addresses supplied are missing or incorrect, the manuscript shall not be processed pending contact with the corresponding author.

Acknowledgements: Authors must acknowledge individuals who do not qualify as authors but who contributed to the research presented. Authors must acknowledge any assistance that they have received (e.g. provision of writing assistance, literature searching, data analysis, administrative support, supply of materials), describing if and how this assistance was funded and included with other funding information. The acknowledgements should be brief and not include thanks to anonymous referees and editors. Where scientists are acknowledged, a covering letter demonstrating their consent must be provided.

Conflict of interest: A subheading "Conflict of interest statement" must be placed at the end of the manuscript text (following acknowledgements), where all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately bias or influence their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, or direct or indirect funding.

Funding sources: All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should state this clearly.

Use of non-commercially available instrumentation, substances, antibodies or assays: When these had been kindly provided by any research group or company, an appropriate letter from them **MUST** be provided alongside the manuscript at submission (upload it as a well identified supplementary file).

3. Manuscript Requirements

3.1. Format

The manuscript must be typed (Times, font 12) with double spacing throughout and with a margin of at least 3 cm on the left-hand side. Lines must be numbered in a consecutive manner starting on the first page, in the left-hand margin. All pages of the manuscript must also be numbered consecutively, including those containing references, tables, and captions to illustrations, all of which are to be placed after the text. Illustrations, both line drawings and photographs, are to be numbered as figures in a

common sequence. The text should be prepared using standard software (Microsoft Word), doc; do not use automated or manual hyphenation.

On page one of the manuscript the official name of the institution, the place where the work was carried out, the title of the article, and the names of authors must be stated as follows: Town, Country (no mailing address); Title of Article; Name A, Name B, and Name C. The title should be concise and appropriately informative and should contain all keywords necessary to facilitate retrieval by modern search techniques. Additional keywords not already contained in the title or contents (abstract, summary) may be listed beneath the contents. An abridged title suitable for use as a running head at the top of the printed page and not exceeding 50 letters and spaces should also be supplied. Each original paper, review or short communication shall contain a short contents (abstract, summary), preferably less than 250 words. The contents should not just recapitulate the results but should state concisely the scope of the work and give the principal findings, avoiding acronyms and references. The contents shall be complete enough for direct use by abstracting services.

Original articles should be structured in the following order: Title, Contents, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgment and References. Placement of figures and tables should be indicated in the text. The experimental design should be described in sufficient detail (methods, analyses, statistics, breeds, origin, and management of animals etc.) to allow for repetition of the experiments.

If the paper is one of a numbered series, a reference to the previous part should be given as a footnote on the first page. If a part not yet published needs to be consulted for a proper understanding of the paper, an electronic copy of that manuscript should be supplied to assist the referees. The corresponding author postal and a functional e-mail address must appear at the end of the paper. Sets of identical data should not be given in tables and figures. Figures and tables should be accompanied by a legend.

The manuscript comprises a printout of the text, figures, tables, and a list of all figures and tables with their captions and titles on a separate piece of paper. We ask that you convey the essential information within the first 60 characters of the captions to accommodate the online edition. Each figure, table, and bibliographic entry must have a reference in the text. For all figures please include reproduceable artwork (marked with the author's name, short title, and figure number). Please do not import the figures into the text file.

3.2. Length

Original papers and review articles, including figures, tables and references, should not exceed 5,000 words. Short Communications (case reports and technical notes), should not exceed 1,800 words, including figures, tables and references. The number of figures and tables should be kept to a minimum. Extended data sets can be published online as supplementary material and should be identified as such.

3.3. Units, abbreviations and nomenclature

All specifications must be stated according to the S.I. System. Concentrations of chemical solutions are to be given in mol/l. All other concentrations should be given in % (volume or weight). All products implemented are to be mentioned with the manufacturer's name and delivery address which should appear in a footnote on the same page.

Any abbreviations of chemical, biological, medical, or other terms should only be employed when it is certain that they are internationally known. The full name must be stated in brackets when the abbreviation is first used.

All biological, medical, chemical, or other terms should be used according to the most recent recommendations of respective international nomenclature. Enzymes should be given according to the Enzyme Nomenclature (Elsevier Publishing Co., 1965). In the case of commercially obtained substances or reagents, the name and address of the manufacturer or supplier should be given as a footnote, when they are first mentioned in the text. Products (preparations etc.) with a registered trademark should be marked with ®. When non-commercially available substances or reagents are used, the following text must be provided: “[kindly provided by (name of the person plus the research group address or company name and location) and the corresponding date]”

Bacterial names should be in accordance with the latest edition of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (The Williams and Wilkins Co., Baltimore). Viruses are to be given the classification and names recommended by the International Committee on the Nomenclature of Viruses.

3.4. Illustrations and tables

Original Photographs or drawings must be sharp and of high contrast. Figures should be saved in a neutral data format such as TIFF or EPS, and a printout should always be included. Powerpoint and Word graphics are unsuitable for good quality

reproduction. Please do not use any pixel-oriented programmes. Scanned figures (only in TIFF format) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size. Please note that figures will generally be reduced to fit within the column-width or the print area. This means that numbering and lettering must still be readable when reduced (e.g. maps) and that the scale might not correspond with the original (microscopic pictures), thereby invalidating references to scale in the text. If artwork is to be scanned, line drawings should only be contour drawings without halftones (shades of grey). Please do not use patterns; rough hatching is possible. Graphs with an x and y axis should not be enclosed in frames; only 2-dimensional representations. Do not forget the labels and units. Captions for the figures should give a precise description of the content and should not be repeated within the figure.

Please submit the data for figures in black and white. However, colour photos can be reproduced in black and white (with a possible loss of contrast). Colour graphics should be created using the RGB mode. There is a charge for alterations to figures when carried out by the publisher. Figures printed in colour are subject to an added charge. In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures our figures in colour in the printed version of the journal, *Reproduction in Domestic Animals* offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher. Colour print charges are explained on the Colour Work Agreement Form. Once completed, please return the form to:

Customer Services (OPI), John Wiley & Sons Ltd, European Distribution Centre, New Era Estate, Oldlands Way, Bognor Regis, West Sussex, PO22 9NQ

Scanned or faxed copies will not be accepted. Please direct queries to the Production Editor atrda@wiley.com.

Tables should be created using the table function.

3.5. References

In the text, citations are listed chronologically by the author and date and are not numbered. All citations in the text must be listed at the end of the paper, according to the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors established in

1979. References should be listed in alphabetical order of the first author's name and all the authors should be listed.

The following are examples of the styles required for citing a book chapter, a journal article, and an entire book. For conference proceedings, be sure to include the name(s) of the editor(s) of the proceedings, the publisher and the place of publication.

Ewald C, Apel G, von Mickwitz G, 1988: Erfahrungen mit der Vakzination gegen die Haemophilus-Pleuropneumanie der Stewing. Berl Münch Tierärztl Wschr 102, 6-11.

Mair A, Diebschlag W, Distl O, Kräußlich W, 1988: Analysis of pressure distribution on the foot soles of cattle. J Vet Med A 35, 696-704.

Niemann H, Elsaesser F, 1983: Steroid hormones in early pig embryo development. In: Bavister BD (ed), The Mammalian preimplantation Embryo. Plenum Press New York, pp. 117-132.

Citations in the text should be given by placing in parenthesis the name(s) of author(s) and the year of publication, e.g. (Thein and Härtl 1986), (Ewald et al. 1988), (Mair et al. 1988; Nieman and Elsaesser 1983).

All entries in the reference list must correspond to citations in the text. No editorial responsibility can be taken for the accuracy of the references, and authors are requested to check these with special care. Papers that have not been accepted for publication are not to be included in the list of references and must be cited either as 'unpublished data' or as 'personal communication'. The use of such citations is discouraged. It is the author's responsibility to ensure that they have permission to cite material as a personal communication.

3.6. Laboratory animals

Papers reporting work with animals should include a reference to the code of practice adopted for the experimentation. Editors will take account of ethical and animal welfare issues and reserve the right not to publish.

4. Proof correction and offprints

When you receive proofs of your article, please check, correct, and return them electronically to the Editor-in-Chief without delay (within 3 days of receipt), as e-annotated proofs. As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors.

5. Book reviews

Book reviews appear irregularly at the end of the journals. Books submitted for review are sent by the editors to a scientist involved in the special research area. No fee is paid for reviews, but the review copy of the book (either as hard copy or electronic copy) remains the property of the reviewer. Each review should begin with exact bibliographical data on the publication, according to the following pattern:

Author(s) and/or editor(s), publication title, subtitle, edition, title of the publication series (and possibly its editors) in which the book has appeared, publisher, place of publication, year of publication, number of pages, number of illustrations, tables, and diagrams, cover material (e.g. paperback, quarter cloth binding etc.), retail price. Example:

Immelmann, F.: Introduction to Animal Behaviour. Revised and extended 3rd edition. Pareys Studentexte No. 13. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg. 1983. 223 pp., 106 figs., Balacron paperback, Euro 28.0.