

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU-SP

**MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS OVINOS COM O
USO DA ROSCOVITINA E CICLOHEXEMIDA**

LETÍCIA FERRARI CROCOMO

ABRIL, 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU-SP

**MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS OVINOS COM O
USO DA ROSCOVITINA E CICLOHEXEMIDA**

LETÍCIA FERRARI CROCOMO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP
– Botucatu para obtenção do título de Mestre
em Medicina Veterinária, área de Reprodução
Animal

Orientador: Prof. Sony Dimas Bicudo

Co-orientadora: Prof^a Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

ABRIL, 2011

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

Crocomo, Letícia Ferrari.

Maturação *in vitro* de oócitos ovinos com o uso da roscovitina e ciclohexemida / Letícia Ferrari Crocomo. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Sony Dimas Bicudo

Co-orientador: Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Capes: 50504002

1. Ovino – Maturação. 2. Biotecnologia animal. 3. Reprodução animal.

Palavras-chave: *Cumulus*; Inibidores; Meiose; Ovinos; Ultraestrutura.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Autora: Letícia Ferrari Crocomo

Título: Maturação *in vitro* de oócitos ovinos com o uso da roscovitina e ciclohexemida

Data: 20/04/2011

Nome

Assinatura

Prof. Sony Dimas Bicudo

Dr^a. Yeda Fumie Watanabe

Prof^a. Maria Denise Lopes

DEDICATÓRIA

A todos meus familiares.

Em especial, aos meus pais, Antonieta e Wilson, por todo suporte emocional e intelectual, por todo apoio, dedicação, confiança, incentivo, cuidado e paciência.

Ao meu irmão, Leandro e à Luciana pelo convívio, torcida e preocupação.

Ao meu companheiro de hoje e sempre, Wolff Camargo Marques Filho, pelo amor, apoio, cumplicidade, paciência e confiança, e aos seus familiares, que considero como meus, por todo carinho e cuidado.

E a todos meus professores pelo ensinamento, paciência e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À minha família e ao meu eterno companheiro de todos os momentos, Wolff e seus familiares, que foram, são e sempre serão essenciais e especiais em minha vida.

A todos os meus professores, pelo ensinamento e convívio. Em especial ao professor Sony Dimas Bicudo, pela oportunidade e orientação; à professora Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, por todo auxílio, por permitir a utilização do laboratório e pelo tempo dedicado; à professora Maria Denise Lopes, por todo apoio, colaboração e amizade, e ao professor João Carlos Pinheiro Ferreira pelo incentivo e contribuição intelectual.

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências, pelo processamento das amostras para avaliação ultraestrutural.

Aos funcionários dos frigoríficos Marfrig, Cowpig e DomPig, pela receptividade e por permitirem a coleta de material.

Aos colegas Mateus, Midyan, Daniela, Bianca, Natália, Camila, Tatiana, Sabrina, e a todos os estagiários pela contribuição para a execução desta pesquisa.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, pela formação pessoal e profissional.

À FAPESP, pela bolsa concedida e possibilidade de realização do mestrado.

Ao Curso de pós-graduação, pelo aprimoramento científico.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para meu crescimento e formação pessoal, intelectual e profissional e que, por falta de minha memória, não tenham sido mencionados.

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1. Porcentagem de oócitos imaturos nos diferentes estadios de maturação nuclear (MN).....	43
Tabela 2. Efeito do cultivo <i>in vitro</i> por 24 horas em meio de maturação padrão (Grupo Controle) acrescido de 100 µM de roscovitina sobre a expansão das células do <i>cumulus</i> de COCs de ovinos.....	46
Tabela 3. Estadios da maturação nuclear (MN) de oócitos de ovinos cultivados <i>in vitro</i> por 24 horas em meio de maturação padrão (grupo controle) suplementado com 100 µM roscovitina.....	47
Tabela 4. Efeito do cultivo <i>in vitro</i> por 24 horas em meio de maturação padrão (Grupo Controle) acrescido de 1µg/mL de ciclohexemida sobre a expansão das células do <i>cumulus</i> de COCs de ovinos.....	51
Tabela 5. Estadios da maturação nuclear (MN) de oócitos de ovinos cultivados <i>in vitro</i> por 24 horas em meio de maturação padrão (Grupo Controle) suplementado com 1µg/mL de ciclohexemida.....	52
Tabela 6. Expansão das células do <i>cumulus</i> de COCs de ovinos após o cultivo <i>in vitro</i> por 24 horas na presença de 100 µM de roscovitina seguido por mais 22 horas na ausência deste fármaco. Grupo Controle: cultivo <i>in vitro</i> por 46 horas em meio de maturação livre de fármacos inibidores da meiose.....	54

- Tabela 7.** Estádios de maturação nuclear (MN) de oócitos de ovinos cultivados por 24 horas na presença de 100 μ M de roscovitina e por mais 22 horas na ausência deste fármaco. Grupo Controle: cultivo *in vitro* por 46 horas em meio de maturação livre de fármacos inibidores da meiose..... **55**
- Tabela 8.** Expansão das células do *cumulus* de COCs de ovinos após o cultivo *in vitro* por 24 horas na presença de 1 μ g/mL de ciclohexemida seguido por mais 22 horas na ausência deste fármaco. Grupo Controle: cultivo *in vitro* por 46 horas em meio de maturação livre de fármacos inibidores da meiose..... **58**
- Tabela 9.** Estádios de maturação nuclear (MN) de oócitos de ovinos cultivados por 24 horas na presença de 1 μ g/mL de ciclohexemida seguido por mais 22 horas na ausência deste fármaco. Grupo Controle: cultivo *in vitro* por 46 horas em meio de maturação livre de fármacos inibidores da meiose..... **59**
- Tabela 10.** Expansão das células do cumulus dos COCs de ovinos após 24 horas de cultivo *in vitro* em meio de maturação padrão (grupo controle) suplementado com 100 μ M de roscovitina (ROSCO) ou 1 μ g/mL ciclohexemida (CICLO)..... **63**
- Tabela 11.** Expansão das células do *cumulus* de COCs de ovinos após o cultivo *in vitro* por 24 horas na presença de 100 μ M de roscovitina ou 1 μ g/mL de ciclohexemida, seguido por mais 22 horas na ausência destes fármacos. Grupo Controle: cultivo *in vitro* por 46 horas em meio de maturação padrão isento de inibidores da meiose..... **64**

- Tabela 12.** Estádios de maturação nuclear (MN) após 24 horas de cultivo *in vitro* na ausência (Grupo Controle) ou presença de roscovitina (100 μ M) ou de ciclohexemida (1 μ g/mL)..... **66**
- Tabela 13.** Estádios da maturação nuclear (MN) de oócitos de ovinos após o cultivo *in vitro* por 24 horas na presença de 100 μ M de roscovitina ou 1 μ g/mL de ciclohexemida, seguido por mais 22 horas na ausência destes fármacos. Grupo Controle: cultivo *in vitro* por 46 horas em meio de maturação padrão isento de inibidores da meiose..... **68**
- Tabela 14.** Características ultraestruturais dos COCs de ovinos antes (condições prévias) e após o cultivo *in vitro* por 24 horas na ausência (controle) e na presença de roscovitina (100 μ M) ou de ciclohexemida (1 μ g/mL)..... **70**
- Tabela 15.** Características ultraestruturais dos COCs de ovinos após o cultivo *in vitro* por 24 horas na presença de 100 μ M de roscovitina ou 1 μ g/mL de ciclohexemida, seguido por mais 22 horas na ausência destes fármacos. Grupo Controle: cultivo *in vitro* por 46 horas em meio de maturação padrão livre de inibidores da meiose..... **71**

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. (A) Lavagem dos ovários de ovelha com solução fisiológica a 35 °C; (B) Aspiração folicular dos ovários de ovelha; (C) Controle da temperatura em 35°C para os ovários e fluido folicular, (D) Aspecto do fluido folicular no tubo falcon.....	33
Figura 2. Estereomicroscópio (Olympus SZ51) utilizado para visualização e seleção dos COCs; e placa aquecedora para controle da temperatura em 35°C para os COCs.....	34
Figura 3. Classificação dos COCs de ovelhas agrupados em diferentes graus de acordo com as características das células do <i>cumulus</i> e do ooplasma (MORTON et al., 2005): (A) GRAU 1; (B) GRAU 2; (C) GRAU 3; (D) COCs desnudos; (E) COCs com <i>cumulus</i> expandido (aumento 30X).....	34
Figura 4. Micrografia do aspecto e expansão das células do <i>cumulus</i> de COCs de ovinos: A: expansão total das células do <i>cumulus</i> ; B: ausência de expansão das células do <i>cumulus</i> (aumento 30 X).....	38
Figura 5. Micrografia: configurações cromossômicas da meiose em oócitos corados com bisbenzimidazol (Hoechst 33342): vesícula germinativa (A); quebra de vesícula germinativa (B); metáfase I (C); metáfase II (D); degenerado ou não identificado (E) (aumento 200X); (F) Microscópio Leica equipado com epifluorescência utilizado para visualização dos oócitos corados com Hoechst 33342.....	40
Figura 6. Características ultraestruturais de COCs ovinos imaturos: (A) células do <i>cumulus</i> (cc) compactas, espaço perivitelínico	

pequeno; e aspecto geral do ooplasma; (1800X); **(B)** prolongamentos das células do *cumulus* (seta negra) e complexos juncionais (jc) (círculo negro) (31500X); **(C)** complexos juncionais: junções gap comunicantes (seta branca) e junções adesivas (seta negra) (107500X); **(D)** mitocôndrias pleomórficas aglomeradas, grânulos de lipídeo(l), unidade metabólica (seta branca), complexo de Golgi (círculo negro) (17000X); **(E)** grânulos de lipídeo, aglomerado de mitocôndrias e de grânulos corticais, figuras mielínicas (seta negra) (7750X); **(F)** grumos de grânulos corticais (quadrado negro), complexo de Golgi (círculo branco) (17000X)..... **45**

Figura 7. Características ultraestruturais de COCs de ovinos após 24 horas de maturação (controle): **(A)** expansão total das células do *cumulus* (cc), ausência dos prolongamentos citoplasmáticos das células do *cumulus* através da zona pelúcida (zp), e ausência dos complexos juncionais (2450X); **(B)** espaço perivitelínico bem desenvolvido, muitas microvilosidades (mv), figuras mielínicas, e grânulos corticais (cg) alinhados (9750X); **(C)** mitocôndrias (m) pleomórficas, grânulos de lipídeos (l) e figuras mielínicas (seta negra) (9750X)..... **48**

Figura 8. Características ultraestruturais de COCs ovinos após 24 horas de cultivo *in vitro* na presença de 100 µM de roscovitina: **(A)** expansão parcial das células do *cumulus* (cc), sinais de degeneração como núcleo picnótico (seta branca), ausência prolongamentos citoplasmáticos das células do *cumulus* através da zona pelúcida (zp) (3250X); **(B)** aspecto geral do ooplasma, grânulos de lipídeos (l), figuras mielínicas (seta negra) (5750X); **(C)** espaço perivitelínico (ps) bem desenvolvido, mitocôndrias

pleomórficas, grânulos corticais alinhados (círculo branco) (5750X); **(D)** poucas microvilosidades, poucos complexos juncionais (círculo negro); retículo endoplasmático dilatado, mitocôndrias pleomórficas (7750X)..... **50**

Figura 9. Características ultraestruturais de COCs ovinos após 24 horas de cultivo *in vitro* na presença de 1µg/mL de ciclohexemida: **(A)** expansão total das células do *cumulus* (cc), ausência de prolongamentos das células do cumulus através da zona pelúcida (zp), ausência complexos juncionais (jc) (1800X); **(B)** mitocôndrias pleomórficas dispersas por todo ooplasma, poucos grânulos de lipídeos (l), muitas figuras mielínicas (círculo branco) (9750X); **(C)** espaço perivitelínico (ps) bem desenvolvido, muitas microvilosidades (mv), grânulos corticais alinhados à membrana do oócito (círculo branco) (9750X)..... **53**

Figura 10. Características ultraestruturais de COCs ovinos após 46 horas de cultivo *in vitro* (controle): **(A)** expansão, dispersão e perda das células do *cumulus* (cc) (2450X); **(B)** aspecto geral do ooplasma, mitocôndrias dispersas, grânulos de lipídeo (l), figuras mielínicas (círculo branco) (7750X); **(C)** espaço perivitelínico (ps) bem desenvolvido e muitas microvilosidades, grânulos corticais isolados e alinhados, área de vazio citoplasmático (seta negra) (7750X)..... **56**

Figura 11. Características ultraestruturais de COCs ovinos após 24 horas de cultivo *in vitro* na presença de 100 µM de roscovitina, seguido por 22 horas na ausência de fármacos inibidores da meiose: **(A)** aspecto geral do citoplasma, mitocôndrias dispersas, muitos grânulos de lipídeo (l), figuras mielínicas (seta negra), áreas de vazio citoplasmático (seta branca) (7750X); **(B)** poucos grânulos corticais isolados e

alinhados, grânulos de lipídeo (l), áreas de vazios citoplasmáticos (seta branca) (9750X)..... 57

- Figura 12.** Características ultraestruturais de COCs ovinos após 24 horas de cultivo *in vitro* na presença de 1µg/mL de ciclohexemida, seguido por 22 horas na ausência de fármacos inibidores da meiose: **(A)** expansão total das células do *cumulus* (cc), sem perda de células (2450X); **(B)** prolongamentos das células do cumulus (seta negra), ausência complexos juncionais, espaço perivitelínico (sp) bem desenvolvido, grande quantidade de microvilosidades, grânulos de lipídeo (seta branca), figuras mielínicas (seta branca), grânulos corticais isolados e alinhados à membrana do oócito (círculo negro) (9750X); **(C)** aspecto geral do ooplasma, muitas mitocôndrias dispersas, muitos grânulos de lipídeos (3250X).)..... 60
- Figura 13.** Porcentagem de COCs de acordo com o grau de expansão das células do *cumulus*, após 24 horas de cultivo *in vitro* em meio de maturação padrão (Controle) suplementado com 100 µM de roscovitina ou 1µg/mL de ciclohexemida. (Valores com letras diferentes dentro do mesmo grau de expansão das células do *cumulus* são significativamente diferentes)..... 61
- Figura 14.** Porcentagem de COCs de acordo com o grau de expansão das células do *cumulus*, após o cultivo *in vitro* por 24 horas na presença de 100 µM de roscovitina ou 1µg/mL de ciclohexemida, seguido por mais 22 horas na ausência destes fármacos. Controle: cultivo *in vitro* por 46 horas em meio de maturação padrão livre de inibidores da meiose. (Valores com letras diferentes, dentro do mesmo grau de expansão das células do *cumulus* são significativamente diferentes)..... 62

Figura 15. Porcentagem de COCs nos diferentes estadios de maturação nuclear (MN) após 24 horas de cultivo *in vitro* em meio de maturação padrão (Controle) suplementado com 100µM de roscovitina ou 1µg/mL de ciclohexemida. VG = vesícula germinativa; QVG = quebra de vesícula germinativa; MI = metáfase I; MII = metáfase II, DEG = degenerado. (Valores com letras diferentes dentro do mesmo estadio da maturação nuclear são significativamente diferentes)..... **65**

Figura 16. Porcentagem de COCs diferentes estadios de maturação nuclear (MN), após o cultivo *in vitro* por 24 horas na presença de 100 µM de roscovitina ou 1µg/mL de ciclohexemida, seguido por mais 22 horas na ausência destes fármacos. Controle: cultivo *in vitro* por 46 horas em meio de maturação padrão isento de inibidores da meiose. VG = vesícula germinativa; QVG = quebra de vesícula germinativa; MI = metáfase I; MII = metáfase II, DEG= degenerado. *p>0,05 = não houve diferença significativa entre os grupos experimentais..... **67**

LISTA DE ABREVIATURAS

AC = adenilato ciclase

AI = anáfase I

ATP = adenosina trifosfato

cAMP = adenosina 3` - 5` monofosfato cíclico

cdk1= quinase dependente de ciclina 1

COC = complexo *cumulus*-oócito

c-mos = proto-oncogene mos

c-ras = proto-oncogene ras

c-raf = proto-oncogene raf

Deg/N.I.= degenerado ou não identificado

DMSO = dimetilsulfóxido

ERK = quinase regulada por sinal extracelular

FSH = hormônio folículo estimulante

GC = grânulo cortical

GJC = junção GAP comunicante

G6PDH= enzima glicose 6-fosfato desidrogenase

LH = hormônio luteinizante

MAPK = proteína quinase ativada por mitógenos

MEK ou MAPKK = proteína quinase ativadora da MAPK

MI = metáfase I

MIV = maturação *in vitro*

MII = metáfase II

MOS = proteína quinase MOS

MPF = fator promotor da maturação

mRNA = ácido ribonucléico mensageiro

p34^{cdc2}: subunidade catalítica do MPF

PDE = enzima fosfodiesterase

PIV = produção *in vitro* de embriões

PKA = proteína quinase A

QVG = quebra da vesícula germinativa

RAF: proteína quinase RAF

RAS: proteína quinase RAS

TGF- β = fatores de crescimento transformantes beta

Thr 14 = treonina 14

TI = telófase I

Tyr 15 = tirosina 15

VG= Vesícula germinativa

Tyr 15 = tirosina 15

VG= Vesícula germinativa

SUMÁRIO

RESUMO	xxii
ABSTRACT	xxiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1.Oogênese e foliculogênese	3
2.2.Maturação Oocitária.....	6
2.2.a.Maturação Nuclear.....	7
2.2.a.1.Reinício da maturação nuclear <i>in vivo</i>	7
2.2.a.2.Reinício da maturação nuclear <i>in vitro</i>	8
2.2.b.Maturação Citoplasmática	9
2.2.b.1.Modificações estruturais no oócito.....	10
- Grânulos corticais.....	11
2.2.b.2.Maturação Molecular.....	11
- Poliadenilação.....	12
2.2.c.Moléculas envolvidas no bloqueio e reinício meiótico.....	13
2.2.c.1. Adenosina 3'- 5' monofostato cíclico (cAMP).....	13
2.2.c.2.Proteína Quinase Ativada por Mitógenos (MAPK).....	15
2.2.c.3.Fator Promotor da Maturação (MPF).....	17
2.3.Qualidade do Oócito.....	18

2.3.a.Aspectos biológicos e biotecnológicos implicados na aquisição de competência oocitária.....	19
2.3.b.Células do <i>cumulus</i> e sua importância para o oócito.....	20
2.4.Métodos para seleção de COCs competentes para PIV.....	22
2.5.Métodos para avaliação da maturação oocitária.....	24
2.6. Inibidores da maturação nuclear oocitária <i>in vitro</i>	26
2.6.a.Ciclohexemida.....	27
2.6.b.Roscovitina.....	29
3.HIPÓTESE.....	31
4.OBJETIVO.....	31
5.MATERIAL E MÉTODOS.....	32
5.1.Coleta e manipulação dos ovários e oócitos.....	32
5.2.Classificação e seleção dos COCs.....	33
5.3. Delineamento experimental.....	35
5.4.Maturação oocitária.....	36
5.4.a.Inibição da maturação nuclear oocitária <i>in vitro</i>	36
5.4.b.Retomada da maturação nuclear oocitária <i>in vitro</i>	37
5.5.Avaliação da maturação oocitária <i>in vitro</i>	38
5.5.a. Avaliação da expansão das células do <i>cumulus</i>	38
5.5.b.Avaliação da maturação nuclear.....	38
5.5.c.Avaliação da maturação citoplasmática.....	41

5.6.Análise estatística.....	42
6.RESULTADOS.....	43
6.1.Etapa I- Condição prévia dos COCs.....	43
6.1.a.Avaliação da expansão do <i>cumulus</i>	43
6.1.b.Avaliação da maturação nuclear.....	43
6.1.c.Avaliação da maturação citoplasmática.....	44
6.2.Etapa II – Inibição meiótica oocitária.....	46
6.2.a.Roscovitina (Etapa II - primeiro experimento).....	46
6.2.a.1.Avaliação da expansão do <i>cumulus</i>	46
6.2.a.2.Avaliação da maturação nuclear.....	46
6.2.a.3.Avaliação da maturação citoplasmática.....	47
- COCs do grupo controle.....	47
- COCs tratados com roscovitina.....	49
6.2.b.Ciclohexemida (Etapa II- segundo experimento).....	51
6.2.b.1.Avaliação da expansão do <i>cumulus</i>	51
6.2.b.2. Avaliação da maturação nuclear.....	51
6.2.b.3. Avaliação da maturação citoplasmática.....	52
- COCs do grupo controle.....	52
- COCs tratados com ciclohexemida.....	52
6.3.Etapa III - Reversibilidade da inibição meiótica.....	54
6.3.a.Roscovitina (Etapa III - primeiro experimento).....	54

6.3.a.1. Avaliação da expansão do <i>cumulus</i>	54
6.3.a.2. Avaliação da maturação nuclear.....	54
6.3.a.3. Avaliação da maturação citoplasmática.....	55
- COCs do grupo controle.....	55
- COCs tratados com roscovitina.....	57
6.3.b. Ciclohexemida (Etapa III - segundo experimento).....	58
6.3.b.1. Avaliação da expansão do <i>cumulus</i>	58
6.3.b.2. Avaliação da maturação nuclear.....	58
6.3.a.3. Avaliação da maturação citoplasmática.....	59
- COCs do grupo controle.....	59
- COCs tratados com roscovitina.....	59
6.4.Comparação dos resultados obtidos nas etapas I, II, III.....	61
6.4.a.Comparação da expansão do <i>cumulus</i>	61
6.4.b.Comparação da maturação nuclear.....	64
6.4.b.1. Eficiência da inibição meiótica (Etapa II).....	64
6.4.b.2.Reversibilidade da inibição meiótica (Etapa III).....	66
6.4.c. Comparação da maturação citoplasmática.....	69
7- DISCUSSÃO.....	72
7.1. Expansão das células do <i>cumulus</i>	72
7.2. Maturação nuclear.....	75
7.2.a.Condição prévia dos COCs.....	75

7.2.b. Inibição meiótica (Etapa II).....	77
- Grupo controle.....	77
- Roscovitina (Etapa II - primeiro experimento).....	78
- Ciclohexemida (Etapa II - segundo experimento).....	81
7.2.c. Reversibilidade da inibição meiótica (Etapa III).....	82
- Grupo controle.....	82
- Roscovitina (Etapa III - primeiro experimento).....	83
- Ciclohexemida (Etapa III - segundo experimento).....	84
7.2.d. Comparação da eficiência e reversibilidade da inibição meiótica promovida pela roscovitina e ciclohexemida.....	85
7.3. Maturação citoplasmática.....	86
7.3.a. Análise das características ultraestruturais dos COCs de ovinos antes (imaturos) e após (maturados) o cultivo <i>in vitro</i> por 24 horas em meio de maturação padrão livre de fármacos inibidores da meiose.....	86
- Espaço perivitelínico.....	86
- Mitocôndrias e grânulos de lipídeo.....	87
- Retículo endoplasmático.....	89
- Complexos de Golgi e grânulos corticais.....	89
7.3.b. Maturação citoplasmática dos COCs cultivados <i>in vitro</i> , por 24 horas, na presença de 100 µM de roscovitina ou 1µg/mL de ciclohexemida.....	91

7.3.c. Maturação citoplasmática dos COCs cultivados <i>in vitro</i> por 46 horas, sendo 24 horas na presença de 100 µM de roscovitina ou 1µg/mL de ciclohexemida e 22 horas na ausência de fármacos.....	92
8 – IMPLICAÇÕES.....	93
9 – CONCLUSÕES.....	95
10 – REFERÊNCIAS.....	96
ANEXO I.....	111
ANEXO II.....	112
CAPÍTULO1- Cytoplasmic progression and ultrastructure changes in ovines COCs <i>in vitro</i> cultured with roscovitine or cycloheximide.....	115

RESUMO

CROCOMO, L.F. **Maturação *in vitro* de oócitos ovinos com o uso da roscovitina e ciclohexemida.** Botucatu, 2011, 156p. (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Área: Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

Este estudo visou avaliar e comparar a eficiência e reversibilidade da inibição meiótica promovida pela roscovitina e ciclohexemida nos COCs de ovinos cultivados *in vitro*, assim como analisar o efeitos desses inibidores da meiose sobre a ultraestrutura dos COCs e expansão das células do *cumulus*. Para isto, COCs grau 1 e 2 recuperados de ovários de ovelhas, obtidos em frigoríficos, foram cultivados, por 24 horas a 38,5°C e atmosfera com 5% de CO₂, em meio de maturação constituído por TCM 199 suplementado com 0,1UI/mL de FSH; 0,1UI/mL de LH; 0,3mM de piruvato; 75µg/mL de penicilina/estreptomicina; 10% SFB e 100µM/mL de cisteamina (Grupo Controle) acrescido de 100µM de roscovitina ou 1µg/mL de ciclohexemida (Grupos Tratamentos). Para retomada e progressão da maturação nuclear, os COCs foram cultivados por mais 22 horas em meio de maturação livre de inibidores da meiose, nas mesmas condições acima descritas. Após 24 e 46 horas de cultivo *in vitro*, os COCs foram avaliados quanto à expansão das células *cumulus* em estereomicroscópio, quanto à maturação nuclear em microscópio de fluorescência e quanto à maturação citoplasmática, em microscópio eletrônico de transmissão. Foi constatado adequado bloqueio meiótico em 53,07% e 89,67% dos COCs tratados com roscovitina e ciclohexemida, respectivamente. Em ambos os tratamentos, o bloqueio meiótico foi reversível, com aproximadamente 60% dos oócitos em MII ao final de 46 horas de cultivo *in vitro*. No entanto, o tratamento com roscovitina inibiu de maneira irreversível a expansão do *cumulus* em aproximadamente 90% dos COCs e também afetou a ultraestrutura oocitária. Em contrapartida, no tratamento com ciclohexemida, 84,23% dos COCs apresentaram expansão total do *cumulus* ao final de 46 horas de cultivo *in vitro*, e houve adequada progressão da maturação citoplasmática, o que denota que a ciclohexemida confirmou a hipótese proposta no presente estudo.

Palavras-chave: meiose, inibidores, *cumulus*, ultraestrutura, ovinos.

ABSTRACT

CROCOMO, L.F. *In vitro* maturation of ovine oocytes with roscovitine and cycloheximide. Botucatu, 2011. 156p. (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Área de concentração: Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

This study aimed to evaluate and compare the efficiency and reversibility of meiotic inhibition promoted by roscovitine and cycloheximide in ovine COCs *in vitro* cultured, as well as, to assess the effects of these inhibitors on the ultrastructure of COCs and on the *cumulus* cells expansion. To this, grades I and II COCs recovered from ovines ovaries, obtained from slaughterhouse, were cultured, for 24 hours at 38.5°C in a 5% CO² humidified air atmosphere, in a specific maturation medium consisting of TCM 199 supplemented with 0,1UI/mL FSH, 0,1UI/mL LH, 1µg/mL estradiol, 0,3mM sodium pyruvate, 75µg/mL penicillin/ streptomycin, 10% FBS and 100µM/mL cysteamine (Control Group) plus 100 µM roscovitine or 1µg/ml cycloheximide (Treatment Groups). For the resumption and progression of nuclear maturation, COCs were cultured for another 22 hours in maturation medium free of meiosis inhibitors in the same conditions (as described before). After 24 and 46 hours of *in vitro* culture, COCs were evaluated according to *cumulus* cells expansion under stereomicroscope, to nuclear maturation under fluorescence microscope and to cytoplasmic maturation under electronic transmission microscope. There was adequate meiotic arrest in 53,07% and 89,67% of COCs treated with roscovitine and cycloheximide, respectively. In both treatments, the meiotic arrest was reversible, with approximately 60% MII oocytes at the end of 46 hours of *in vitro* culture. However, treatment with roscovitine irreversibly inhibited the *cumulus* expansion by approximately 90% of COCs and also affected the ultrastructure of COC. In contrast, in the treatment with cycloheximide, 84,23% of COCs showed total *cumulus* expansion at the end of 46 hours of *in vitro* culture, and there was adequate progression of cytoplasmic maturation, which indicates that the cycloheximide confirmed the hypothesis proposed in this study.

Key-words: meiosis, inhibitors, *cumulus*, ultrastructure, ovines

1 - INTRODUÇÃO

A ovinocultura tem se intensificado no agronegócio brasileiro, nos últimos anos, impulsionando o desenvolvimento e aprimoramento de estratégias reprodutivas viáveis e lucrativas, visando maior eficiência produtiva do rebanho em concomitância com o progresso genético (MORAES et al., 2007). Diante deste cenário, a produção de embrião *in vitro* (PIV) surge como uma biotecnologia promissora, uma vez que possibilita a recuperação de complexos *cumulus-oócitos* (COCs) de folículos em diferentes estádios de desenvolvimento, que desapareceriam *in vivo* por subordinação ou atresia (GILCHRIST, 2008); a utilização de uma mesma doadora de oócitos desde a pré-puberdade até a senilidade e período recente após a morte (SIMPLÍCIO et al., 2007); e a preservação de animais de excelente nível genético. Além disso, consiste numa alternativa às técnicas invasivas de recuperação de embriões *in vivo*, e numa importante ferramenta para pesquisa relacionada à transgenia, clonagem e para o esclarecimento dos processos fisiológicos que ocorrem *in vivo* e aprimoramento da técnica *in vitro* (GONÇALVES et al., 2008; TRALDI, 2008).

A PIV envolve desde a coleta dos COCs, seguida pela maturação e fecundação dos oócitos *in vitro*, até o cultivo embrionário *in vitro*, visando à obtenção de embriões viáveis em estádio de desenvolvimento adequado para transferência à fêmea receptora ou para criopreservação (BALDASSARRE, 2008). Entre estas etapas, a maturação oocitária *in vitro* é considerada crucial, uma vez que o potencial de desenvolvimento oocitário e embrionário está diretamente relacionado à adequada maturação citoplasmática e nuclear (RIZOS et al., 2002).

Deste modo, o reinício meiótico espontâneo, independentemente do estádio de maturação citoplasmática, decorrente da simples remoção mecânica dos COCs do ambiente folicular (PINCUS & ENZMANN, 1935) consiste num importante entrave ao sucesso da PIV em ovinos, uma vez que resulta em assincronia entre os processos de maturação nuclear e citoplasmática e conseqüentemente em menor potencial de desenvolvimento oocitário e menores taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* (BLONDIN et al., 1997).

Neste contexto, várias modificações nas condições de maturação *in vitro* (MIV) têm sido propostas visando maior eficiência biotecnológica (LE BEUX et al., 2003), como a pré-maturação *in vitro* dos COCs sob condições capazes de impedir a progressão meiótica, garantindo assim, tempo adicional para que o oócito sofram as modificações necessárias para aquisição de competência (PONDERATO et al., 2001). Além disso, a eficiência da MIV está na dependência da qualidade do oócito que é influenciada e determinada por inúmeros fatores como o metabolismo celular, o diâmetro oocitário e folicular, a presença das células do *cumulus*, as condições fisiológicas das fêmeas doadoras de COCs, as condições de cultivo *in vitro*, entre outros (KRISHER, 2004).

Constata-se, portanto, que apesar dos inúmeros estudos e recentes avanços, ainda existem limitações biológicas e biotecnológicas para o sucesso da PIV na ovinocultura. Assim, a compreensão dos aspectos fisiológicos envolvidos na oogênese e foliculogênese, e dos complexos mecanismos envolvidos na regulação da maturação oocitária é essencial para identificação de estratégias que permitam melhorar os índices de produção de embriões *in vitro* (MÁXIMO, 2009).

Dessa forma, dada à relevância do tema e a necessidade de ampliação do conhecimento referente à produção *in vitro* de embriões ovinos, esta pesquisa se propôs a analisar e comparar a eficiência e reversibilidade da inibição meiótica promovida pelos fármacos roscovitina e ciclohexemida, adicionados individualmente ao meio de maturação, visando à sincronização da maturação nuclear e citoplasmática nos oócitos de ovinos cultivados *in vitro*. Além disso, o efeito do tratamento com estes fármacos sobre a expansão das células do *cumulus* e sobre a ultraestrutura dos COCs também foi analisado

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Oogênese e Foliculogênese

A Oogênese ou ovogênese corresponde ao fenômeno biológico no qual as células germinativas primordiais, diplóides, também designadas gonócitos, dão origem aos oócitos, que correspondem às células sexuais femininas, haplóides (RÜSSE, 1983), sendo caracterizado por 3 etapas distintas denominadas multiplicação ou mitose, crescimento e maturação ou meiose (ARAÚJO et al., 2007). Já a foliculogênese corresponde a um processo dinâmico e complexo caracterizado pela proliferação e diferenciação das células foliculares ao redor dos oócitos, com conseqüente formação, crescimento e maturação dos folículos, os quais proporcionam um ambiente ótimo para a maturação do oócito e sua preparação para a fertilização após a ovulação (ARMSTRONG & WEBB, 1997).

Estes dois eventos em associação resultam na formação da unidade funcional dos ovários, caracterizada pelo oócito rodeado pelas células foliculares (ARAÚJO et al., 2007). Na maioria das espécies, ambos os processos se iniciam ainda na vida pré-natal e só se completam após a puberdade com a ovulação e fecundação (WASSARMAN, 1988).

A foliculogênese se inicia após e termina antes da oogênese e pode ser dividida em duas fases: a fase pré-antral, que é subdividida em ativação dos folículos primordiais e crescimento dos folículos primários e secundários; e a fase antral, subdividida em crescimento inicial e terminal dos folículos terciários, De Graaf ou pré-ovulatório (MARTINS et al., 2008).

No início do desenvolvimento fetal, os gonócitos, originários da endoderme do saco vitelínico próximo ao alantóide, através de movimentos amebóides, migram para a crista genital ou gonadal em formação no interior do embrião. Neste local, perdem suas características de mobilidade, começam a se multiplicar através de sucessivas divisões mitóticas e sofrem redistribuição das organelas citoplasmáticas, transformando-se em oogônias (SADEU et al., 2006).

Ainda durante a vida intra-uterina, após o período de divisão mitótica e crescimento, as oogônias iniciam a primeira fase da meiose, fase de

maturação, e diferenciam-se em oócitos (HIRSHFIELD, 1991). As divisões meióticas são, no entanto, interrompidas no estadio diplóteno da prófase I, morfologicamente identificado pela vesícula germinativa (VG), devido ao núcleo esférico e bem definido dos oócitos neste estadio (PIERSON, 1993). Assim permanecem até a puberdade, sendo designados como oócitos de primeira ordem, primários ou imaturos (MOORE & PERSAUD, 1994).

Ao longo deste processo, os oócitos são circundados por camada plana de células precursoras da granulosa, constituindo assim, os folículos primordiais (VAN DEN HURK et al., 1997). Durante o período de repouso meiótico oocitário, os folículos continuam a crescer e a se diferenciar até o estadio ovulatório (ADONA et al., 2008), e os oócitos sofrem algumas mudanças bioquímicas e citoesqueléticas, que caracterizam a maturação citoplasmática, e são essenciais para aquisição de competência oocitária (BERTAGNOLLI et al., 2004). Desta forma, todas as fêmeas de mamíferos já nascem com uma reserva de folículos primordiais com oócitos no estadio de prófase I. No entanto, na época do nascimento e também na puberdade quantidade substancial destes folículos e oócitos sofre atresia (HAFEZ, 1995).

Com a ativação dos folículos primordiais, as células precursoras da granulosa que rodeiam os oócitos se transformam em células da granulosa cubóides e começam a se proliferar, determinando a diferenciação dos folículos primordiais à folículos primários em transição (HIRSHFIELD, 1991).

Deste modo, os folículos de transição se caracterizam pela presença de células da granulosa com ambos os formatos pavimentoso e cúbico enquanto que nos folículos primários, o oócito é circundado por uma camada completa de células da granulosa de formato cúbico (GOUGEON & BUSSO, 2000). Uma característica marcante dos folículos primários é a formação da membrana translúcida ao redor do oócito, conhecida como zona pelúcida, que resulta na perda da proximidade entre o oócito e as células da granulosa (RANKIN et al., 2001). Sendo assim, a comunicação intercelular deixa de ser via endocitose e são desenvolvidas as junções “gap” comunicantes (GJCs), que são canais intercelulares que permitem a passagem de nutrientes, íons inorgânicos, segundo mensageiros e pequenos metabólitos (KIDDER & MHAWI, 2002). Além da mudança da forma das células da granulosa, o volume citoplasmático e nuclear do oócito aumenta consideravelmente (HIRSHFIELD, 1991).

Embora os sinais responsáveis pela ativação dos folículos primordiais e pelo desenvolvimento à folículo primário ainda não estejam completamente esclarecidos (FORTUNE et al., 2000), evidências indicam o predomínio de uma regulação local nesta fase pré-antral, com participação ativa do oócito e sua interação com as células da granulosa através da sinalização parácrina. Diversos fatores de crescimento estão envolvidos nesta sinalização parácrina incluindo alguns integrantes da família dos “fatores de crescimento transformantes β ” (TGF- β), o fator de células tronco também conhecido como kit ligante, o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) além de vários outros fatores como a ativina, folistatina, inibina e fator de crescimento epidermal (EGF) (BURATINI, 2007).

Conforme os folículos continuam o desenvolvimento, se transformam em folículos secundários, caracterizados pela presença de duas a três camadas de células da granulosa. Nos folículos antrais, há formação do antro, que consiste numa cavidade no interior do folículo, a qual é preenchida por um fluido viscoso originário do plasma sérico composto por hormônios esteróides secretados pelas células da granulosa (BARNETT et al., 2006). Como consequência, as células da granulosa são separadas, ficando um grupo de células dispostas em várias camadas concêntricas ao redor do oócito, caracterizando o *cumulus*-oócito, e outro grupo de células da granulosa forrando a parede folicular, designadas células foliculares (HAFEZ, 1995).

Junto a esse processo, ocorre a formação da camada da teca folicular ao redor da granulosa, sendo que o limite entre estas duas estruturas é determinado pelo desenvolvimento da membrana basal. As células da teca formam duas sub-camadas: a teca externa, que está constituída, quase que totalmente, por tecido conjuntivo e a teca interna, que corresponde à camada vascular interna, que sob influência do LH, secreta andrógeno. As células da granulosa e da teca interagem sendo responsáveis pela esteroidogênese folicular (KENNEY et al., 1979)

A fase antral do desenvolvimento folicular é dependente das gonadotrofinas. Segundo Fortune et al., (2001), o hormônio folículo estimulante (FSH) é responsável pelo recrutamento e crescimento de folículos antrais nas ondas foliculares, além de estimular a expressão de receptores de LH (hormônio luteinizante) nos estádios finais de desenvolvimento folicular.

Na maioria dos animais domésticos, o reinício das divisões meióticas ocorre mais precisamente próximo à ovulação, sob estímulo primário do LH (DEKEL et al., 1988). De acordo com Tosti (2006), este reinício das divisões meióticas marca o início da maturação nuclear oocitária.

Por ação das gonadotrofinas e outros fatores, que serão enfatizados posteriormente, o oócito primário completa a primeira divisão da meiose, originando 2 células haplóides. Uma das células que preserva pouco citoplasma é expulsa para o espaço perivitelínico e se desintegra logo a seguir, caracterizando o primeiro corpúsculo polar. A outra célula grande, rica em citoplasma (designada como oócito secundário) inicia a segunda etapa da maturação (segunda meiose), que novamente é interrompida na fase de metáfase II (MII), sendo concluída no momento da fecundação, quando ocorre a extrusão do segundo corpúsculo polar (ARAÚJO et al., 2007).

2.2- Maturação oocitária

De acordo com Eppig (1996), a maturação oocitária corresponde ao período entre os bloqueios meióticos nos estádios de prófase I e metáfase II, em que ocorrem eventos nucleares e citoplasmáticos que garantem ao oócito competência para finalizar a maturação, ser fertilizado e sustentar os estádios iniciais do desenvolvimento embrionário. Devido a isto, consiste numa das etapas mais importantes da produção de embriões tanto *in vitro* como *in vivo* (MERMILLOD et al. 1999).

A maturação oocitária envolve basicamente dois eventos que, apesar de distintos, são interligados e, *in vivo*, ocorrem simultaneamente em determinados momentos (BREVINI-GANDOLFI & GANDOLFI, 2001): a maturação nuclear, que se inicia com a quebra de vesícula germinativa (QVG) e termina apenas quando a meiose é finalizada, sendo marcada pela segregação dos cromossomos e extrusão de 2 corpúsculos polares; e a maturação citoplasmática, caracterizada por alterações oocitárias morfológicas e funcionas (TOSTI, 2006). Segundo Eppig (1996), este processo é regulado por uma complexa interação de diversas moléculas, que ainda não está totalmente esclarecida.

2.2.a - Maturação nuclear

De acordo com Voronina & Wessel (2003) a maturação nuclear ou meiótica corresponde à divisão reducional dos cromossomos, que tem como objetivo central a produção dos gametas haplóides, aptos para fecundação e posterior desenvolvimento embrionário. Como descrito anteriormente, este processo se inicia ainda na vida uterina, sendo que a maioria dos mamíferos já nasce com uma reserva de oócitos bloqueados no estadio de vesícula germinativa (HAFEZ, 1995), caracterizado pela presença de núcleo vesicular com nucléolo distinto circundado por filamentos de cromatina descondensados (MA et al., 2003).

2.2.a.1 – Reinício da maturação nuclear *in vivo*:

O reinício da maturação meiótica é desencadeado por diferentes mecanismos que envolvem: um estímulo positivo capaz de superar as condições que mantêm o bloqueio meiótico, caracterizado pela onda pré-ovulatória do hormônio luteinizante (LH), em mamíferos (MOOR et al., 1981), e pela síntese de substâncias indutoras da meiose pelas células da granulosa; e a remoção do sinal inibitório, caracterizado pelos fatores inibidores da meiose secretados pelas células foliculares, que são solúveis no meio folicular e agem nos oócitos via células do *cumulus* (EPPIG, 1991; RICHARD & SIRARD, 1996).

In vivo, a elevação pré-ovulatória de LH é considerada responsável primária pela indução da maturação oocitária. No entanto, esta gonadotrofina não atua diretamente no oócito, uma vez que este não apresenta receptores para LH (PENG et al., 1991). Ao invés, sua ação é mediada por fatores parácrinos secretados pelas células da granulosa, e pelo transporte de mensageiros celulares das células da granulosa/*cumulus* para os oócitos através das junções “gap” comunicantes (GJCs) (GILULA et al., 1978).

Deste modo, a regulação gonadotrófica da QVG é atribuída: à perda da comunicação intercelular entre o complexo *cumulus-oócito* (COC) e as células foliculares, reduzindo assim a transferência de substâncias inibidoras da maturação para o oócito; à síntese de fatores indutores da meiose pelas células do *cumulus*, os quais são transmitidos para os oócitos através das GJCs (DEKEL et al., 1988); à oscilação da concentração de segundo mensageiros, no oócito e nas células do *cumulus* (TSAFRIRI et al., 1996) e à

fosforilação e desfosforilação proteica mediada por quinases e fosfatases, com consequente ativação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e do fator promotor da maturação (MPF), considerados reguladores do ciclo celular (FAN & SUN, 2004).

2.2.a.2- Reinício maturação nuclear *in vitro*:

Quando os COCs são removidos dos folículos, ocorre reinício “espontâneo” da meiose (PINCUS & ENZMANN, 1935), independente do estágio de maturidade citoplasmática e do estímulo gonadotrófico, sugerindo que os componentes do ambiente folicular exercem efeito inibitório sobre a maturação oocitária *in vivo* (AKTAS et al., 2003). Para Byskov et al. (1997), isto ocorre devido à interrupção da transferência de fatores inibidores da QVG para o oócito decorrente da perda do contato dos COCs com as células da granulosa murais, também designadas células foliculares, com as quais estabelecia comunicação através das GJCs.

Além disso, COCs coletados de pequenos folículos antrais ainda não completaram o desenvolvimento molecular e celular necessários para suportar a maturação e a fase inicial da embriogênese (GILCHRIST & THOMPSON, 2007), resultando na assincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática, e consequentemente em menores taxa de desenvolvimento embrionário (BLONDIN et al., 1997). Neste contexto, a pré-maturação dos COCs na presença de substâncias capazes de inibir reversivelmente a meiose consiste numa estratégia que visa à adequada progressão da maturação citoplasmática e consequente restabelecimento da sincronia com a maturação nuclear (HASHIMOTO et al., 2002).

A retomada da maturação meiótica, induzida *in vivo* pela onda pré-ovulatória de LH e *in vitro*, pela remoção dos oócitos do ambiente folicular, é caracterizada pela QVG, estágio no qual ocorre dissolução da membrana nuclear e condensação da cromatina (CURCIO et al., 2006). Posteriormente, o oócito passa pelos estágios de metáfase I (MI), anáfase I (AI) e telófase I (TI), completando assim a primeira divisão meiótica, com a formação do primeiro corpúsculo polar (DEKEL, 2005). Em seguida, há progressão ao estágio de MII, caracterizado pela presença dos cromossomos arranjados no centro do fuso e

corpúsculo polar no espaço perivitelínico. Esta habilidade em reiniciar e completar a meiose é adquirida gradualmente durante a foliculogênese (MERMILLOD et al., 2008).

Os mecanismos envolvidos no processo de bloqueio e o reinício das divisões meióticas ainda não estão totalmente esclarecidos, mas estudos indicam que são modulados por diversas moléculas (TOSTI, 2006), que apresentam efeito inibitório ou estimulatório sobre a maturação oocitária (AKTAS et al., 2003). Deve-se salientar ainda que os processos celular e molecular da maturação oocitária *in vivo* e *in vitro* são diferentes em determinados aspectos, uma vez que, *in vivo* há ação gonadotrófica sobre as células da granulosa e indução da expressão de fatores indutores da maturação nuclear, o que não ocorre *in vitro* (GILCHRIST & THOMPSON, 2007).

2.2.b - Maturação citoplasmática

Os complexos eventos que ocorrem durante a maturação oocitária, não envolvem somente a correta dinâmica de separação cromossômica durante a maturação nuclear, mas também a redistribuição das organelas citoplasmáticas, o estoque de energia, a transcrição de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA), e a síntese de proteínas, além de outros fatores necessários para o processo de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário (FERREIR et al., 2008).

A capacidade do oócito em bloquear a poliespermia no caso de fertilização, promover a descondensação do espermatozóide já no interior do ooplasma, formar o pronúcleo após a fertilização, e sustentar as fases iniciais do desenvolvimento embrionário depende da adequada maturação citoplasmática (PICTON et al., 1998). No entanto, os mecanismos moleculares que regulam este processo ainda não estão totalmente esclarecidos (GOSDEN, 2002).

O processo de maturação citoplasmática inclui modificações estruturais no oócito, caracterizadas pela redistribuição de organelas citoplasmáticas, pela dinâmica dos filamentos do citoesqueleto, e pela maturação molecular (FERREIRA et al., 2008).

2.2.b.1 - Modificações estruturais no oócito

Em síntese, ao longo da oogênese e folículo-logênese até próximo a retomada da maturação nuclear ocorre: formação das GJCs entre o oócito e suas células somáticas circundantes; desenvolvimento e deslocamento do complexo de Golgi para a periferia do oócito; secreção dos grânulos corticais e das proteínas da zona pelúcida pelo Complexo de Golgi; desenvolvimento do retículo endoplasmático liso e formação das gotas lipídicas; diferenciação e aumento da quantidade de mitocôndrias; formação e estoque de ribossomos; transcrição e armazenamento de mRNA materno para a síntese protéica, a qual é fundamental para a retomada da maturação nuclear e para fase inicial da embriogênese (HYTTEL et al., 1997).

Com a retomada da maturação nuclear, a maioria das organelas migra para o centro da célula. No oócito imaturo, as mitocôndrias e o complexo de Golgi se localizam periféricamente. Ao longo da progressão meiótica, as mitocôndrias aumentam em quantidade, assumem posição mais central no ooplasma e passam a se associar as gotículas de lipídeo (HYTTEL et al., 1989). Este reposicionamento das mitocôndrias é crucial para o oócito e para o embrião e está diretamente relacionada ao maior requerimento de energia ao longo dos subsequentes estádios do desenvolvimento (STOJKOVIC et al., 2001).

O complexo de Golgi diminui o seu desenvolvimento e praticamente desaparece (HYTTEL et al., 1997), e o retículo endoplasmático, que durante o estádio de VG, se encontra distribuído uniformemente no ooplasma, conforme há progressão para o estádio MII, se desloca para região cortical do ooplasma (FERREIRA et al., 2008). Modificações bioquímicas e estruturais no retículo endoplasmático são extremamente importantes, uma vez que esta organela é responsável pelo armazenamento e liberação de íons de cálcio, pela síntese de proteínas e metabolismo de lipídeos (LIPPINCOTT-SCHWARTZ et al., 2000).

Este direcionamento de moléculas e organelas no interior das células é controlado pelos filamentos do citoesqueleto, que também são responsáveis pela segregação dos cromossomos na meiose e mitose, e pela divisão celular (ALBERTS et al., 2004).

- Grânulos Corticais

Os grânulos corticais (GC) merecem especial atenção uma vez que sua migração no ooplasma consiste numa das etapas mais importantes na maturação citoplasmática, sendo utilizada como um critério de avaliação desta (DAMIANI et al., 1996). Os grânulos corticais são organelas derivadas do complexo de Golgi, encontradas exclusivamente nos oócitos, e responsáveis pela reação cortical que impede a poliespermia. A composição destes grânulos inclui uma grande diversidade de proteínas, moléculas estruturais, enzimas e glicosaminoglicanos (FERREIRA et al., 2008).

Nos oócitos em estadio de VG, os grânulos corticais estão distribuídos, em grumos, por todo citoplasma (HOSOE & SHYOIA, 1997). Conforme a maturação meiótica progride, os GCs migram em direção ao córtex do oócito, sendo que no final do período de maturação, quando o oócito alcança o estadio de MII, os grânulos se encontram próximo à superfície interna da membrana plasmática, formando uma monocamada estratégica para aguardar a penetração do espermatozóide (THIBAULT, 1987).

Com a fertilização, ocorre a fusão dos GCs à membrana plasmática e exocitose dos seus conteúdos em resposta à elevação da concentração do cálcio intraoocitário (CARNEIRO et al., 2002). Este evento conhecido como reação cortical, é um dos mecanismos para impedir a poliespermia, a qual resultaria em clivagem anormal do zigoto e degeneração embrionária (FERREIRA et al., 2008).

Segundo Schoevers et al. (2005), a incidência de poliespermia é mais elevada em oócitos maturados *in vitro* quando comparada àqueles maturados *in vivo*, provavelmente devido à imaturidade citoplasmática dos oócitos maturados *in vitro*. Com a maturação oocitária também ocorre expansão das células do *cumulus* (KRUIP et al., 1983), e mudanças morfológicas nas GJs, resultando em redução do fluxo de substâncias das células da granulosa para o oócito (BEVERS et al., 1997).

2.2.b.2 - Maturação molecular

Pouco se conhece sobre a maturação molecular, pois nem sempre esta pode ser detectada em nível estrutural. Segundo Sirard et al. (2006), a maturação molecular envolve a transcrição, estoque e processamento de

mRNAs que serão traduzidos em proteínas pelos ribossomos. Estas proteínas estão envolvidas no processo de maturação e nos eventos celulares subsequentes, tais como fertilização, formação dos pronúcleos e fase inicial da embriogênese (SIRARD, 2001).

A transcrição e estoque de mRNA e proteínas ocorre durante o desenvolvimento folicular, enquanto o núcleo celular se encontra em quiescência meiótica, e cessa quando há a GVBD com a retomada da meiose, uma vez que os cromossomos se tornam condensados e “inativos” (BREVINI-GANDOLFI & GANDOLFI, 2001). Desta forma, embora a habilidade de síntese de proteínas não seja afetada após o reinício da meiose, tanto *in vivo* como *in vitro*, o oócito perde a capacidade de transcrição do mRNA, que é restabelecida apenas após a ativação do genoma embrionário (BLONDIN & SIRARD, 1995).

A eficiência do armazenamento de proteínas e mRNAs, assim como a reativação oportuna destas moléculas armazenadas determina a competência do oócito para o desenvolvimento embrionário (SIRARD, 2001). A maior parte do mRNA persiste no ooplasma em sua forma estável, porém inativa, sendo mobilizada no processo de maturação oocitária e na fase inicial do desenvolvimento embrionário. A transcrição, o armazenamento e a reativação do mRNA é regulado pelo processo de poliadenilação (BREVINI-GANDOLFI & GANDOLFI, 2001).

- Poliadenilação

Segundo Tomek et al. (2002), a poliadenilação, que consiste na adição de adenina à porção terminal 3' do mRNA, estimula a liberação de moléculas repressoras acopladas à porção 5', permitindo assim o início da tradução do mRNA. Em outras palavras, esta cauda confere estabilidade ao mRNA. Assim sendo, mRNAs com cauda poli-A curta são traducionalmente inativos devido a sua baixa estabilidade, e o aumento desta cauda, por ação da enzima poli-a polimerase, determina a tradução do mRNA (LEQUARRE et al., 2004).

Este processo de poliadenilação começa no núcleo, onde em torno de 250 a 300 resíduos de adenina são adicionados ao mRNA para formação da cauda poli-A. Posteriormente, este mRNA é transportado para o citoplasma aonde é estocado num estado inativo, caracterizado pela redução desta cauda

poli-A (TOMEK et al., 2002). À medida que ocorre o desenvolvimento do oócito, os mRNAs são ativados pelo aumento da cauda, com conseqüente tradução e síntese proteica (FERREIRA et al., 2008).

Ainda de acordo com Brevini-Gandolfi et al. (1999), mRNAs estocados no ooplasma de oócitos que não adquiriram a plena competência para o desenvolvimento possuem a cauda poli A menor do que aqueles encontrados em oócitos competentes. Este dado relaciona o tamanho curto da cauda poli A à baixa competência para o desenvolvimento (LEQUARRE et al., 2004).

Os principais transcritos produzidos durante a maturação molecular dos COCs são, entre outros, reguladores do ciclo celular, como: o fator promotor de maturação (MPF) e suas subunidades formadoras ciclina B e a p34^{cdc2}; a proteína do pro-oncogene *c-mos*, MOS; e a proteína *kinase* ativada por mitógeno (MAPK), além de inúmeras outras moléculas envolvidas na regulação dos eventos celulares essenciais para aquisição de competência oocitária (FERREIRA et al., 2008).

2.2.c- Moléculas envolvidas no bloqueio e reinício meiótico

Os complexos mecanismos envolvidos na regulação da maturação oocitária não estão totalmente elucidados, mas se reconhece a importância do estímulo hormonal desencadeante da maturação meiótica *in vivo*, de determinadas proteínas como RAS, RAF, MOS, MEK, MAPK, MPF, e de segundos mensageiros como cAMP, entre outros fatores (GULER et al., 2000). Segundo Wehrend e Meinecke (2001), o reinício meiótico e o processo de maturação são regulados pela fosforilação e desfosforilação proteica que são mediadas por proteínas quinases e fosfatases, respectivamente. Vale ressaltar ainda que a maior parte do conhecimento referente à regulação da maturação oocitária foi obtida a partir de estudos com sapos *Xenopus laevis* e camundongos.

2.2.c.1 - Adenosina 3´- 5´ monofosfato cíclico (cAMP)

O bloqueio prolongado dos oócitos no estadió de prófase I e subsequente reinício meiótico está correlacionado com mudanças na concentração intraoocitária de cAMP (KAWAMURA et al., 2004). No entanto, a cAMP não é a única molécula envolvida nestes processos.

A cAMP ou adenosina 3'-5' monofosfato cíclico é um segundo mensageiro celular derivado da adenosina trifosfato (ATP) através da ação da enzima adenilato ciclase (AC), que está localizada nas membranas celulares e pode ser ativada ou inibida através das proteínas G. Estas proteínas G correspondem a um conjunto de proteínas acopladas aos receptores da membrana celular e envolvidas na cascata de segundo mensageiros, que responde ao estímulo hormonal ou à qualquer outro estímulo (MARZZOCO & TORRES, 2007). De acordo com DEKEL et al., (1981) a cAMP pode ser produzida endogenamente nos oócitos, ou transferida aos oócitos pelas células do *cumulus* através das GJCs.

A ativação da enzima adenilato ciclase promove aumento na concentração intracelular de cAMP, que interage e regula outras proteínas, como a proteína quinase A (PKA) também designada proteína quinase A dependente de cAMP (DOWNS & DUNN, 1995). Na ausência da cAMP, a PKA se mantém como tetrâmero inativo (R2C2) composto por um dímero de subunidades reguladoras (RI e RII), com alta afinidade ao cAMP, vinculadas a 2 subunidades catalíticas (C). A ligação do cAMP às subunidades reguladoras, induz mudanças conformacionais, as quais permitem a liberação dos 2 monômeros ativos C que promovem a fosforilação e desfosforilação de proteínas específicas envolvidas com o bloqueio e reinício meiótico (FRANCIS & CORBIN, 1994).

As PKAs podem ser classificadas ainda em tipo I e tipo II, de acordo como predomínio das subunidades reguladoras (RI ou RII) (BEEBE & CORBIN, 1986). Conforme constatado nos estudos de Downs e Dunn (1995), as PKAs tipo I localizam-se no interior dos oócitos e estão relacionadas à manutenção do bloqueio meiótico. Já no interior das células do *cumulus* foi detectada PKA tipo II, estando relacionada ao reinício meiótico e expansão das células do *cumulus*.

A cAMP tem uma meia-vida muito curta, sendo degradada no interior das células onde se formou, pela ação da enzima fosfodiesterase (PDE). Segundo Tsafiriri et al. (1996), existem dois subtipos de fosfodiesterases: subtipo 3 e subtipo 4, presentes no oócito e nas células foliculares, respectivamente, sendo que a regulação seletiva destas fosfodiesterases pelo estímulo gonadotrófico, determina o reinício meiótico. Em poucos minutos a

concentração de cAMP retorna ao nível basal (THIBAULT et al.,1987). No entanto, a atividade destas PDEs pode ser inibida por derivados de purinas, como as hipoxantinas presentes no fluido folicular, resultando em acúmulo de cAMP intraoocitário e conseqüente manutenção do oócito em estadio de VG (AKTAS et al., 2003)

Estudos sugerem que as gonadotrofinas promovem elevação da concentração de cAMP com conseqüente ativação da PKAII, nas células do *cumulus*, resultando na expressão de substâncias indutoras da QVG e na expansão do *cumulus* (SU et al., 2003). Ainda segundo Dekel et al., (1981), a perda da comunicação entre os COCs e as células foliculares, decorrente do estímulo hormonal ou da remoção dos COCs do ambiente folicular, interrompe a transferência de moléculas inibitórias e cAMP para os oócitos, resultando na redução da concentração intraoocitária de cAMP e decréscimo da atividade da PKAI, com conseqüente retomada das divisões meióticas. De acordo com Tsafiriri et al. (1996), a concentração de cAMP e a ativação seletiva das fosfodiesterases e da adenilato ciclase, nos oócitos e nas células do *cumulus*, determinam o reinício meiótico sob estímulo gonadotrófico.

Desta forma, observa-se que altos níveis de cAMP intra-oocitário inibem o reinício da meiose, enquanto que o decréscimo das concentrações cAMP intra-oocitária e a elevação da concentração de cAMP no interior das células do *cumulus* permitem a QVG (KAWAMURA et al., 2004). Para Downs & Dunn (1995), no entanto, a magnitude da mudança na concentração de cAMP é responsável pelo estímulo da maturação oocitária, e não necessariamente o nível absoluto de cAMP no interior da célula.

2.2.c.2- Proteína Quinase ativada por Mitógenos (MAPK)

A proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) também conhecida como quinase regulada por sinal extracelular (ERK), porque é ativada por sinais extracelulares e os transmite para o interior da célula, pertence à família das proteínas kinases serina-treonina (CAMPBELL et al.,1995), e está envolvida no reinício e progressão da maturação nuclear, na reorganização dos microtúbulos e formação do fuso meiótico, na manutenção do oócito no estadio de MII, e na expansão das células *cumulus* (SU et al., 2003).

A MAPK está presente tanto no oócito, no qual é ativada pela proteína quinase MOS, quanto nas células do *cumulus*, nas quais é ativada por outras proteínas quinases *RAS/RAF*. Segundo Singh e Arlinghaus (1997) e Kolch (2000) MOS, RAF e RAS são proteínas quinases serina/treonina codificadas pelos proto-oncogenes MOS, RAF e RAS sob estímulo extracelular, podendo também ser designadas como c-mos, c-raf, c-ras, e desempenham importante função na regulação da meiose, sendo necessárias para ativação da cascata das MAPKs e consequente para a modulação da atividade do fator promotor da maturação (MPF).

Em ambas as células, a MAPK é ativada através da fosforilação dos resíduos de tirosina e treonina pela MEK, também designada MAPKK (proteína quinase ativadora da MAPK), que é ativada através da fosforilação mediada pelas proteínas MOS no oócito, e RAS/RAF nas células do *cumulus* (FISSORE et al., 1996; SAGATA, 1997).

Segundo Sagata (1997), quando ativada, a MAPK promove a ativação e estabilização do fator promotor da maturação (MPF) nos oócitos, através da inibição de alguns reguladores negativos deste fator e da ativação da enzima cdc25 fosfatase (PALMER et al., 1998). Em oócitos de 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 se mantém alta até o estadio de MII (WEHREND & MEINECKE, 2001). Níveis elevados de MAPK e MPF são necessários para manutenção dos oócitos no estadio de MII, sendo que a fertilização ou ativação partenogenética promove queda abrupta na concentração intraoocitária dessas duas quinases e conduz a conclusão da meiose (OH et al. 1998).

De acordo com Fan e Sun (2004), 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*, sendo que a ativação da MAPK nas células do *cumulus* depende da presença de fatores parácrinos secretados pelo oócito, o que demonstra a capacidade do oócito de controlar sua própria maturação meiótica (SUN et al., 2002). Vale ressaltar ainda que, enquanto *in vivo* a ativação da MAPK é necessária para o reinício meiótico, *in vitro*, a retomada da maturação nuclear ocorre espontaneamente com a remoção do

oócito do ambiente folicular, independente da ativação desta proteína (SILVA, 2008).

Embora evidências indiquem a participação da MOS, MEK, MAPK e MPF na retomada da maturação nuclear e na manutenção do bloqueio meiótico oocitário no estadió de MII, estudos adicionais são necessários para compreensão do exato mecanismo envolvido nestes eventos (HUNT, 1992).

2.2.c.3 – Fator Promotor da Maturação (MPF)

Como descrito anteriormente, a maturação oocitária é regulada por várias seqüências complexas de eventos que culminam com a ativação do fator promotor da maturação (MPF), que é descrito como um regulador universal do ciclo celular tanto na mitose como na meiose (NURSE, 1990).

O MPF é um composto dimérico, que pertence à família das proteínas quinases, e é constituído por uma subunidade catalítica, a quinase dependente de ciclina denominada cdk1 ou p34^{cdc2}, que controla a divisão celular e uma subunidade reguladora, a ciclina B1 (GAUTIER et al., 1988). A aquisição de competência meiótica está associada com a ativação da p34^{cdc2} no final do desenvolvimento oocitário (DE VANTERY et al., 1996) e com a presença de quantidade adequada de ciclina B1 para haver matéria-prima suficiente para ativação do pré-MPF. Segundo Levesque e Sirard (1996), como a concentração de cdk1 se mantém constante ao longo da maturação, acredita-se que a síntese de ciclina B1 seja o fator desencadeante do reinício meiótico.

Em sua forma inativa, pré-MPF, a subunidade catalítica se apresenta fosforilada nos resíduos Thr14 (treonina-14) e Tyr 15 (tirosina-15) (GAUTIER et al., 1988). O MPF é ativado quando ocorre a associação das duas subunidades, p34cdc2 e ciclina B, e desfosforilação dos resíduos Thr14 e Tyr 15, cuja reação é catalisada pela enzima cdc 25 fosfatase (CURCIO et al., 2006). Segundo Nebreda e Hunt (1993), proteínas quinases como a MOS e a MAPK podem estar envolvidas na ativação da enzima cdc 25 fosfatase.

Estudos indicam que a elevada concentração de cAMP intraoocitária inibe a ativação do MPF, por prevenir a desfosforilação dos resíduos Thr14 e Tyr 15 e reprimir a síntese de ciclina B, através da ativação da PKAI (JOSEFSBERG et al., 2003). Segundo Matfen et al. (1994), quando ativa, a PKAI inibe a síntese endógena de MOS, resultando em bloqueio da cascata

mos-MEK-MAPK e inativação da enzima cdc25, com consequente inatividade do MPF.

Sob baixa concentração intraocitária de cAMP e consequentemente de PKA, ocorre a ativação do MPF que promove a fosforilação das proteínas do envoltório nuclear, dissolução do nucléolo; condensação cromossômica e reorganização do citoesqueleto, ou seja, ocorre a QVG e progressão da meiose até MII (DEKEL, 1996).

De acordo com Josefsberg et al. (2003) a atividade do MPF apresenta um padrão oscilatório ao longo da maturação oocitária. A ativação deste fator é necessária para o reinício da meiose, ocorrendo um pouco antes da QVG, e sua atividade elevada é requerida para progressão até o estadio de MI, no qual alcança nível máximo, sofrendo um declínio antes da extrusão do primeiro corpúsculo polar e novo incremento antes de entrar na meiose II, permanecendo elevada até a fertilização. Apesar de já concretizada a idéia de que o MPF é fundamental na maturação nuclear oocitária, ainda não se conhece com exatidão os mecanismos responsáveis por sua ativação (MONDADORI et al 1999).

2.3-Qualidade do oócito

A qualidade intrínseca do oócito reflete seu potencial de desenvolvimento, que está diretamente relacionado à adequada maturação nuclear e citoplasmática e é progressivamente adquirido ao longo da foliculogênese e oogênese, sendo determinante para o desenvolvimento embrionário e para o estabelecimento e manutenção da gestação (LONERGAN et al., 2003). Segundo Krisher (2004), oócitos que não completam a maturação citoplasmática, mesmo havendo progressão da maturação nuclear, são considerados de baixa qualidade e não estão aptos para suportar os posteriores estadios do desenvolvimento. Deste modo, no processo de produção de embriões *in vitro*, se preconiza a seleção de COCs de alta qualidade visando melhores resultados.

2.3.a-Aspectos biológicos e biotecnológicos implicados na aquisição de competência oocitária.

A habilidade do oócito em reiniciar e finalizar a maturação, ser adequadamente fertilizado e suportar os estádios iniciais do desenvolvimento embrionário, tanto *in vivo* como *in vitro*, é determinada e influenciada por inúmeros aspectos biológicos e biotecnológicos. Dentre estes vários aspectos, o diâmetro do oócito e do folículo, que estão diretamente relacionados entre si, consistem em importantes indicadores da qualidade e, conseqüentemente, do potencial de desenvolvimento dos COCs, uma vez que refletem o grau de maturação citoplasmática, caracterizado, principalmente, pelo estoque de proteínas e mRNA (HYTTEL et al., 1997). Logo, de acordo com Marchal et al. (2002), quanto maior o diâmetro oocitário e folicular, maior a aptidão do oócito para suportar os posteriores estádios do desenvolvimento. Blondin e Sirard (1995) relataram ainda que a exposição prolongada do oócito ao ambiente folicular favorece o processo de maturação oocitária, logo, sinais de início de atresia folicular também estão relacionados à oócitos mais competentes.

A qualidade do oócito também é influenciada pelo metabolismo celular, uma vez que o incremento da atividade glicolítica está diretamente relacionado à maior capacidade de desenvolvimento oocitário e embrionário (KRISHER, 2004). Ainda segundo Gardner et al. (2000), oócitos maturados *in vitro* frequentemente apresentam metabolismo energético alterado e redução do potencial de desenvolvimento devido, provavelmente, à deficiência de substratos no meio de cultivo *in vitro*.

Biotecnologias reprodutivas envolvendo a superestimulação ovariana e a coleta de oócitos imaturos seguida pela maturação *in vitro* reduzem a qualidade oocitária, sendo que pequena porcentagem de oócitos submetidos à PIV originam blastocistos viáveis e resultam em gestação (BAVISTER, 1995). Isto provavelmente está relacionado à exposição insuficiente dos COCs a hormônios e outros componentes foliculares (O'BRIEN et al., 1997), à inadequada maturação oocitária e à remoção mecânica das células do cumulus decorrente das técnicas de coleta dos COCs (KRISHER, 2004). Ainda segundo Chaves et al. (2010), o fluido folicular assim como as condições do microambiente de cultivo as quais os oócitos são submetidos interferem de maneira determinante na aquisição de competência (KHURANA & NIEMANN,

2000), podendo afetar o nível de poliadenilação e consequente transcrição do mRNA (POCAR et al., 2001).

Segundo Merton et al. (2003), grande parte dos fatores que determinam o potencial de desenvolvimento oocitário está relacionada às características das fêmeas doadoras de COCs, como: o estágio do ciclo estral no momento de coleta dos COCs, o estadió de desenvolvimento folicular, a condição fisiológica, raça e idade da fêmea doadora de oócitos, entre outros.

De acordo com Khatir et al. (1996), COCs coletados de bovinos pré-púberes são menos competentes e apresentam mais problemas decorrentes da maturação citoplasmática insuficiente (ARMSTRONG, 2001), que aqueles recuperados de adultos. O'Brien et al. (1997) também constataram maior incidência de poliespermia e menor potencial de desenvolvimento embrionário quando COCs de ovelhas pré-púberes foram cultivados *in vitro*. Segundo Salamone et al. (2001), a incompetência dos oócitos de fêmeas pré-púberes está relacionada à deficiência de algumas moléculas essenciais para progressão dos processos de maturação, fertilização e embriogênese, como o MPF e a MAPK. Além disso, Tamassia et al. (2003), relataram que existe variação individual com relação a qualidade do oócito, demonstrando que o potencial de desenvolvimento oocitário é geneticamente controlado.

Han et al. (2006) observaram ainda que o potencial de desenvolvimento dos COCs de caprinos oriundo de folículos de mesmo tamanho e com as mesmas características morfológicas com relação as células do *cumulus* e ao ooplasma, diferiu significativamente, o que sugere que a competência oocitária não é determinada apenas por um aspecto isolado, mas sim, por uma complexa interação de fatores.

2.3.b - Células do *cumulus* e sua importância para o oócito

As células do *cumulus* correspondem ao agrupamento de células somáticas dispostas ao redor do oócito, com o qual estabelecem comunicação através das junções gap comunicantes (GJCs) e constituem a unidade funcional do ovário (GANDOLFI et al., 2005). Esta íntima associação entre as células do *cumulus* e o oócito é fundamental para coordenação da maturação nuclear e citoplasmática e, conseqüentemente, para a aquisição de competência oocitária para suportar os posteriores eventos da fertilização e

desenvolvimento embrionário (SHIMADA & TERADA, 2002). Devido a isso, a presença e o aspecto destas células consistem em um importante indicador da qualidade oocitária e, portanto, merecem especial atenção.

As células do *cumulus* são responsáveis por inúmeras funções biológicas: participam da regulação da maturação oocitária, estando envolvidas no bloqueio e reinício meiótico e na progressão da maturação citoplasmática (TANGHE et al., 2002); garantem a nutrição do oócito através da transferência de nutrientes, íons, nucleotídeos, e aminoácidos pelas GJCs (GANDOLFI et al., 2005); promovem a proteção do oócito contra o estresse oxidativo (TATEMOTO et al., 2000) e permitem a conexão do oócito com o meio externo (SOOM et al., 2002). Além disso, modulam os efeitos dos hormônios e fatores de crescimento durante a maturação oocitária (BYSKOV et al., 1997); conduzem o oócito pelo oviduto, após a ovulação; e direcionam os espermatozoides para a fertilização (SOOM et al., 2002).

Há evidências de que a comunicação entre o oócito e as células do *cumulus* é bidirecional, de modo que os fatores solúveis sintetizados pelos oócitos podem afetar diversas funções das células da granulosa como: a proliferação das células da granulosa, a secreção de inibinas, expressão de receptores de LH, a expansão das células do *cumulus* e a função esteroidogênica das células da granulosa (SHIRAZI et al., 2007). No entanto, pouco se conhece sobre a natureza e função fisiológica desses fatores produzidos pelo oócito. Em resposta a estes fatores, as células do *cumulus* geram um sinal positivo, que através das GJCs, estimulam a QVG (DONG et al., 1996).

Zhang et al. (1995), em seus estudos com COCs de bovinos, observaram que a remoção das células do *cumulus* interferiu negativamente nas taxas de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário, confirmando a importância do suporte celular promovido por estas células através das GJCs. Algumas pesquisas sustentam ainda a idéia de que a ausência das células do *cumulus* favorece a ocorrência de anormalidades no ciclo celular meiótico, como aceleração da progressão meiótica, incapacidade em manter o bloqueio na MII e propensão a sofrer ativação espontânea (COMBELLES et al., 2002). Logo, os aspectos físicos envolvidos nos métodos

de coleta dos COCs, podem comprometer a qualidade oocitária, devido à remoção mecânica deste revestimento de células do *cumulus* (BOLS, 2005).

Sob estímulo da onda pré-ovulatória de LH associada aos fatores parácrinos secretados pelo oócito, *in vivo*, e com a remoção dos COCs do ambiente folicular e ação do FSH presente no meio de maturação *in vitro*, ocorre a expansão das células do *cumulus*, caracterizada pela síntese de uma matriz extracelular rica em ácido hialurônico, resultando em redução da comunicação entre estas células e o oócito (RUSSELL & SALUSTRI, 2006), e interrupção da transferência bidirecional de moléculas reguladoras de inúmeras funções celulares. *In vivo*, os oócitos mantêm contato com as células do *cumulus* até o estadio de MI, havendo perda deste contato durante a progressão para o estadio de MII. *In vitro*, a perda progressiva do contato oócito - *cumulus* começa imediatamente após o início da maturação, ou seja, após a remoção do oócito do ambiente folicular (MOTLIK et al., 1986), contribuindo para assincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática.

Assim, constata-se que a presença das células do *cumulus* e o grau de expansão destas células ao longo da progressão da maturação, estão diretamente relacionados com o potencial de desenvolvimento oocitário (BILODEAU-GOESSEELS & PANICH, 2002).

2.4- Métodos para seleção de COCs competentes para PIV

Considerando os inúmeros fatores implicados na aquisição de competência oocitária, diferentes critérios considerados preditivos do potencial de desenvolvimento oocitário vêm sendo propostos visando maior eficiência biotecnológica, como: o tamanho do folículo (LONERGAN et al., 1994), o nível de atresia folicular (HAGEMANN et al., 1999), a concentração de progesterona no fluido folicular (HAZELEGER et al., 1995), e o diâmetro do oócito (BLONDIN & SIRARD, 1995), entre outros.

Entre estes vários critérios, o método de seleção de COCs imaturos usualmente preconizado na PIV consiste na avaliação morfológica dos COCs sob estereomicroscópio, baseada nas características das células do *cumulus* e do ooplasma. Deste modo, COCs com múltiplas camadas de células do *cumulus* compactas e ooplasma homogêneo são considerados de alta qualidade, enquanto que COCs com células do *cumulus* esparsas, em menor

quantidade ou expandidas e ooplasma escuro, heterogêneo, ou granuloso são considerados de baixa qualidade e, portanto, descartados (BLONDIN & SIRARD, 1995). No entanto, somente esta análise morfológica, que consiste numa avaliação subjetiva, é insuficiente para prever de maneira fidedigna a qualidade dos COCs, uma vez que estes podem ter defeitos genéticos e epigenéticos, que não podem ser identificados visualmente (RODRIGUÉZ-GONZÁLEZ, 2002; SINGH & SINCLAIR, 2007).

A mensuração de parâmetros intrínsecos do oócito, como a atividade mitocondrial, a concentração intracelular de cálcio, a atividade de fosfodiesterases, a expressão de determinados genes, entre outros, também consiste numa alternativa para avaliação da competência oocitária (WANG & SUN, 2007). No entanto, são métodos invasivos e que requerem a destruição dos COCs e, portanto, não podem ser utilizados para prever a qualidade do oócito (MERMILLOD et al., 2008).

O potencial de desenvolvimento embrionário, que pode ser avaliado através da expressão de determinados genes (CORCORAN et al. 2005), do metabolismo embrionário, da sobrevivência embrionária após congelação ou vitrificação e do estabelecimento e manutenção da gestação (RIZOS et al. 2001), também reflete a qualidade do oócito, porém consiste num critério de avaliação tardio (MERMILLOD et al., 2008). A análise do perfil metabólico do meio de cultivo oocitário e embrionário também consiste num método não invasivo de avaliação da qualidade do oócito e do embrião, mas requer o cultivo individual e fornece informações apenas após a execução de procedimentos *in vitro* (GOOVAERTS et al., 2010).

De acordo com Alm et al. (2005), a coloração do oócito com Azul de Cresil Brilhante consiste num método fácil e viável para prever a qualidade oocitária, sem lesar o oócito e interferir nos resultados da PIV. Baseia-se na avaliação da atividade da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) que é sintetizada durante o terço inicial do crescimento do oócito e cuja atividade decresce com a progressão do desenvolvimento oocitário (WASSARMAN, 1988). No entanto, não é uma técnica usualmente realizada na PIV de animais de produção e novos estudos são necessários para avaliar sua viabilidade.

Como o oócito regula algumas funções das células do *cumulus*, a análise da viabilidade e metabolismo destas células pode fornecer informações sobre a competência oocitária (MATZUK et al., 2010). Deste modo, outra alternativa para seleção dos COCs consiste na utilização de marcadores moleculares identificados em tecidos ao redor dos oócitos, como nas células do *cumulus* ou no fluido folicular (MERMILLOD et al., 2008). No entanto, trata-se de um método incerto, trabalhoso, complicado, caro e demorado (GOOVAERTS et al. 2010).

Deste modo, apesar dos recentes avanços na produção de embriões *in vitro*, ainda existe a necessidade de métodos não invasivos que permitam prever com precisão o potencial de desenvolvimento oocitário (GOOVAERTS et al., 2010).

2.5 - Métodos para avaliação da maturação oocitária

Como já visto anteriormente, *in vivo*, após atingir pleno crescimento, o oócito retoma as divisões meióticas sob estímulo gonadotrófico (HYTTEL et al., 1989) e, concomitantemente, o processo de expansão das células do *cumulus* se inicia (RUSSELL & SALUSTRI, 2006). Devido a isso, a análise visual do grau de expansão do *cumulus*, sob estereomicroscópio, após a maturação *in vitro* dos COCs, é usualmente empregada como indicador da maturação e do potencial de desenvolvimento oocitário (GUPTA et al., 2005). Além da estrutura do complexo *cumulus*-oócitos, as características do ooplasma, do espaço perivitelínico e da zona pelúcida também revelam importante informação sobre a maturação oocitária (WANG & SUN, 2007). No entanto, apesar de não-invasivos, estes métodos de avaliação são muito subjetivos.

A maturação oocitária também pode ser determinada através da análise da configuração cromossômica do oócito pelo método da coloração com orceína acética (SHI et al., 2009) ou com lacmóide (HUNTER & POLGE, 1966) ou ainda através da coloração com Hoechst 33342 (DONNAY et al., 2004). Para isso, após o período de incubação *in vitro*, os COCs precisam ser desnudos para que o material nuclear possa ser adequadamente corado. Este desnudamento pode ser realizado através de sucessivas pipetagens com auxílio de micropipetas (SHIOYA et al, 1988), ou com um agitador vórtex

(SIRARD et al., 1988), ou ainda com o uso de enzimas proteolíticas associadas ou não a estes procedimentos mecânicos (MOTLAGH, 2008).

Na coloração com orceína acética ou com lacmóide, após o desnudamento, os oócitos são fixados em lâminas histológicas através da imersão em solução de ácido acético com etanol, por pelo menos 24 horas, e posteriormente corados e examinados sob microscópio de contraste de fase (SHIRAZI & SADEGHI, 2007; SHI et al., 2009). Já no método da coloração com o corante fluorescente bisbenzêmid (Hoechst 33342), após o desnudamento, os oócitos são enxaguados e incubados em solução contendo o corante, sob lâmina histológica coberta com lamínula, por 15 minutos a 38,5°C. Posteriormente são visualizados em microscópio invertido de fluorescência (GRONDAHL et al., 1995) e classificados, de acordo com a configuração cromossômica em diferentes estádios (KUBELKA et al., 1988):

- **Vesícula germinativa (VG)**: no qual o oócito apresenta núcleo vesicular com carioteca íntegra e nucléolo bem definido rodeado por filamentos de cromatina descondensada;

- **Quebra da vesícula germinativa (QVG)**: caracterizada pela presença de cromatina levemente condensada e membrana nuclear fragmentada;

-**Metáfase I (MI)**: no qual os cromossomos estão arranjados na placa metafisária;

-**Metáfase II (MII)**: presença da placa metafisária com corpúsculo polar no espaço perivitelínico, ou de 2 grupos de cromossomos distintos no interior do oócito.

Segundo Staigmiller (1988) o grau de maturidade nuclear dos oócitos também pode ser facilmente avaliado através da visualização do corpúsculo polar no espaço perivitelínico, em microscópio óptico. No entanto, o potencial de desenvolvimento oocitário não é determinado apenas pela adequada progressão da maturação nuclear, mas principalmente pelas alterações estruturais e bioquímicas que ocorrem no oócito durante seu crescimento (KRISHER, 2004). Deste modo, a análise da maturação citoplasmática consiste numa importante ferramenta para determinação do grau de maturidade do oócito.

A maturação citoplasmática pode ser determinada através da análise do aspecto e distribuição das organelas citoplasmáticas assim como da expansão

das células do cumulus e da presença das junções “gap” entre estas células e o oócito, em microscópio eletrônico de transmissão (MÁXIMO, 2009); da análise da migração dos grânulos corticais no ooplasma através da microscopia confocal por varredura a laser ou em microscópio de fluorescência convencional (CHERR et al., 1998); ou ainda através de técnicas de fecundação *in vitro* (CARNEVALE, 1996). Segundo Krisher (2004), apesar dos recentes avanços, ainda não existe uma técnica ideal para avaliação da maturação citoplasmática que não seja a própria fecundação e o posterior desenvolvimento normal do embrião e do feto.

Outros métodos para determinação da maturação oocitária incluem a avaliação morfológica do fuso meiótico e dos filamentos do citoesqueleto dos oócitos através da imunofluorescência com anticorpos antitubulina (ALBARRACÍN et al., 2005). No entanto, constata-se que as técnicas mais eficientes, capazes de prever com relativa precisão o potencial de desenvolvimento oocitário, são invasivas e requerem a destruição do oócito, impossibilitando a aplicação em biotecnologias reprodutivas como a PIV (CHAVES et al., 2010).

2.6 - Inibidores da maturação nuclear oocitária *in vitro*

Como já descrito anteriormente, quando os oócitos são removidos do ambiente folicular, ocorre reinício espontâneo da meiose (PINCUS & ENZMANN, 1935) independente da maturidade citoplasmática, que é extremamente importante para o adequado desenvolvimento oocitário e embrionário.

Na tentativa de restabelecer a sincronia entre os processos de maturação nuclear e citoplasmática e conseqüentemente melhorar o potencial de desenvolvimento oocitário *in vitro*, tem sido proposto a pré-maturação *in vitro* dos COCs sob condições capazes de impedir a progressão meiótica, garantindo assim, tempo adicional para que os oócitos sofram as modificações necessárias para suportar as posteriores etapas de desenvolvimento (PONDERATO et al., 2001). Neste contexto, diversos inibidores fisiológicos e farmacológicos da maturação nuclear veem sendo amplamente estudados em diferentes espécies animais (LE BEUX et al., 2003).

A inibição fisiológica envolve o co-cultivo dos COCs com hemi-seções da parede folicular ou com monocamada de células da teca ou da granulosa (RICHARD & SIRARD, 1996); a incubação com fluido folicular (SIRARD & FIRST, 1988), ou o cultivo de folículos antrais intactos (NASHTA et al., 1998). Já os inibidores farmacológicos envolvem substâncias com ações específicas, como inibidores da transcrição do mRNA (TATEMOTO & TERADA, 1995), inibidores da síntese protéica (TAKAYAMA et al., 2006), inibidores de quinases dependentes de ciclinas (BARRETTO et al., 2007), inibidores das fosfodiesterases (TSAFRIRI et al., 1996), inibidores da fosforilação proteica (SAEKI et al., 1997), entre outros.

Segundo Gilchrist (2008), o tempo de inibição meiótica pode variar de 24 a 48 horas sem comprometimento do potencial de desenvolvimento oocitário. A reversibilidade do bloqueio meiótico com consequente retomada da maturação nuclear depende do posterior cultivo *in vitro* destes mesmos COCs em meio de maturação livre de inibidores, sendo que os oócitos devem alcançar o estadio de MII com correta organização dos microtúbulos no fuso meiótico e adequada expansão das células do *cumulus* (MOTLIK et al., 1998).

De acordo com Le Beux et al. (2003), os fármacos inibidores da meiose devem apresentar três importantes características: promover eficaz bloqueio da maturação nuclear, apresentar efeito totalmente reversível, e não alterar a subsequente capacidade de desenvolvimento dos oócitos. Neste contexto, a determinação da adequada concentração do fármaco empregado, e do tempo de exposição dos COCs a este fármaco são imprescindíveis para obtenção de melhores resultados uma vez que tanto o potencial de ação quando a toxicidade são dose e tempo-dependentes (ALBARRACÍN et al., 2005)

2.6.a - Ciclohexemida

A síntese protéica é essencial para maturação de oócitos de mamíferos (MAYES, 2001), sendo que em bovinos, suínos, caprinos, ovinos e *Xenopus laevis*, é requerida para o reinício meiótico. Portanto, nestas espécies a maturação nuclear pode ser reversivelmente bloqueada no estadio de VG, com o uso de inibidores da síntese proteica como a ciclohexemida (SIMON et al., 1989).

Enquanto em bovinos, Tatemoto e Terada (1995) constataram que a síntese proteica nas primeiras 8 horas de cultivo é indispensável para o reinício meiótico, Moor e Crosby (1986) relataram que, em ovinos, o período crítico consiste nas 2 primeiras horas de cultivo *in vitro*. A síntese proteica também parece ser necessária para progressão das divisões meióticas até o estadió de metáfase I e para manutenção do oócito em MII (SIRARD et al., 1989).

A ciclohexemida é um análogo da tetraciclina que interage com a enzima peptidil transferase, resultando na retenção de peptídeo na subunidade 80S do ribossomo e consequentemente inibição da síntese de proteínas essenciais para maturação nuclear, como a ciclina B1 (LÉVESQUE & SIRARD, 1996). Segundo Simon et al. (1989), este fármaco previne a quebra da vesícula germinativa, mas não impede a condensação cromossômica, o que demonstra que o processo de QVG envolve várias etapas, sendo algumas dependentes e outras independentes da síntese protéica.

Ainda segundo Tatemoto e Terada (1995), a adição de ciclohexemida 6 horas após o início da maturação *in vitro* de COCs de bovinos impediu a retomada da meiose na maioria dos oócitos, no entanto, a adição deste inibidor após 11 horas da MIV, permitiu a QVG e progressão da meiose em significativa proporção de oócitos. Estes resultados permitem inferir que a síntese protéica é inibida preferencialmente na fase inicial da maturação oocitária, sendo que conforme há incremento da atividade do MPF, a eficiência da inibição promovida pela ciclohexemida diminui (FULKA et al, 1986).

Simon et al. (1989) relataram que concentrações de 1 a 20 µg/ml de ciclohexemida inibiram eficaz e reversivelmente a QVG, demonstrando que mesmo baixas concentrações deste fármaco promovem adequado bloqueio da progressão meiótica. Ainda segundo Ye et al. (2002), a ação inibitória deste fármaco é dose-dependente.

Meinecke et al. (2001) constataram que 80,7% e 86,2% dos COCs de bovinos foram bloqueados no estadió de VG após 17 e 24 horas de cultivo *in vitro*, respectivamente, na presença de 10µg/mL de ciclohexemida, sendo que após 24 horas de cultivo em meio livre deste fármaco, 73,6% alcançaram o estadió de MII, demonstrando que a ação da ciclohexemida sobre a maturação nuclear dos oócitos é reversível. Segundo Lonergan et al. (1997) e Simon et al. (1989), o efeito inibitório da ciclohexemida é completamente reversível, em

termos dos oócitos sofrerem QVG e progredirem ao estadió de MII, no entanto, apesar das adequadas taxas de clivagem, os COCs tratados com este fármaco apresentam menor potencial de desenvolvimento em blastocisto.

Kastrop et al., (1991) atribuem este baixo potencial de desenvolvimento embrionário à ação inespecífica da ciclohexemida e à retomada acelerada da meiose após o tratamento dos COCs com este fármaco. Lonergan et al. (1997) constataram que a exposição de COCs de bovinos à ciclohexemida por mais de 12 horas, interfere de maneira significativa e irreversível no potencial de desenvolvimento oocitário, sendo que este efeito é mais evidente quanto maior for o período de incubação na presença deste inibidor. Estas observações discordam, no entanto, de Hunter e Moor (1987), segundo os quais, COCs de bovinos mantiveram sua capacidade de desenvolvimento e Saeki et al. (1997), que relataram o nascimento de bezerros após a transferência de embriões originados de oócitos tratados com ciclohexemida.

Segundo Tatemoto et al. (1994), os oócitos de bovinos completam a QVG após 6 horas da remoção da ciclohexemida, ou seja, duas vezes mais rápido que em oócitos não tratados. Esta aceleração da maturação nuclear, segundo Meinecke et al. (2001), pode estar relacionada ao fato desse fármaco não bloquear completamente a síntese protéica. Takayama et al. (2006) relataram que, embora haja esta aceleração da progressão meiótica, os oócitos requerem tempo de cultivo *in vitro* suficiente para completarem a maturação citoplasmática e estarem aptos a serem fertilizados e para sustentar o desenvolvimento embrionário.

2.6.b- Roscovitina

A Roscovitina é um inibidor específico das quinases dependentes de ciclina, que compete com o ATP pelo seu sítio de ligação na subunidade catalítica do fator promotor da maturação, impedindo a desfosforilação desta subunidade e consequente ativação do MPF que é necessária para progressão das divisões meióticas (MEIJER et al., 1997). De acordo com Wu et al.(2002), devido a especificidade de sua ação, a roscovitina não suprime a síntese e fosforilação de outras proteínas necessárias para progressão da maturação oocitária, no entanto, quando em altas concentrações, pode interferir na atividade da MAPK (MEIJER et al., 1997).

Vigneron et al. (2004) assim como Donnay et al. (2004) e Barretto et al. (2007) constataram que a roscovitina na concentração de 25 uM promoveu eficaz e reversível bloqueio meiótico em COCs de bovinos. Já Albarracín et al. (2005), relataram que o bloqueio meiótico promovido por este fármaco é dose-dependente, sendo que melhores resultados foram obtidos na presença 50 e 100 uM de roscovitina. No entanto, devido a constatação de alterações estruturais nos COCs cultivados *in vitro* por 24 horas na presença de 100 uM de roscovitina, estes autores estabeleceram 50 uM como a concentração mínima capaz de promover adequada e reversível inibição meiótica. Do mesmo modo, Lonergan et al. (2003) observaram que a roscovitina na concentração de 125uM promoveu alterações na membrana nuclear, nas mitocôndrias e grânulos corticais de COCs de bovinos.

Esta discrepância entre os autores com relação à concentração ideal de roscovitina para o bloqueio meiótico pode estar relacionada à espécie animal em estudo, à origem dos ovários, às condições de cultivo *in vitro* dos COCs, à metodologia empregada para avaliação dos COCs, entre outros fatores (ALBARRACÍN et al., 2005).

Ponderato et al. (2001) constataram que a pré-maturação dos COCs de bovinos com roscovitina não melhorou e também não reduziu o potencial de desenvolvimento embrionário que se manteve semelhante ao controle. Já Hashimoto et al. (2002) relataram melhores taxas de desenvolvimento embrionário e sugeriram que modificações nas condições de cultivo *in vitro* podem melhorar os resultados. Donnay et al. (2004), no entanto, constataram significativo decréscimo na taxa de blastocistos, e atribuíram-no ao provável envelhecimento celular, devido à exposição prolongada dos COCs às condições de cultivo *in vitro*.

Trabalhando com COCs de bovinos, Adona e Leal (2004) verificaram que o cultivo *in vitro* por 18 a 20 horas após 24 horas de inibição meiótica com roscotivina foi suficiente para que mais de 80% dos oócitos atingissem o estadio de MII, de maneira semelhante ao relatado por Donnay et al. (2004), o que demonstra que a maturação nuclear é acelerada após o tratamento com este fármaco, assim como ocorre com a ciclohexemida.

A razão para esta aceleração ainda não está totalmente esclarecida, mas acredita-se que durante o bloqueio da meiose, os oócitos acumulam

fatores relacionados ao controle da progressão do ciclo celular e que nem todos os eventos envolvidos na maturação são bloqueados (VIGNERON et al., 2004). As conseqüências desta aceleração parecem não ser prejudiciais ao desenvolvimento embrionário, já que alguns estudos relatam taxas de desenvolvimento embrionário semelhantes às obtidas em oócitos que não foram tratados com estes inibidores (PONDERATO et al., 2002 e 2001).

Apesar das inúmeras pesquisas, o emprego de substâncias farmacológicas e fisiológicas para inibir a meiose oocitária ainda não tem aplicabilidade prática, uma vez que não promovem incremento no potencial de desenvolvimento embrionário, sendo destinados apenas como ferramenta de estudo dos mecanismos envolvidos na aquisição de competência oocitária.

3 – HIPÓTESE

A inibição meiótica reversível promovida pelos fármacos roscovitina e ciclohexemida, nos COCs de ovinos cultivados *in vitro*, confere tempo adicional para a progressão da maturação citoplasmática e consequente sincronização com a maturação nuclear.

4 - OBJETIVO

1. Avaliar e comparar o potencial dos fármacos roscovitina e ciclohexemida, adicionados individualmente ao meio de maturação, em retardar a progressão da maturação nuclear, sem afetar a maturação citoplasmática, em oócitos de ovinos cultivados *in vitro*.
2. Avaliar a reversibilidade da ação dos fármacos roscovitina e ciclohexemida e a continuidade dos processos de maturação nuclear e citoplasmática.
3. Avaliar o efeito destes fármacos sobre a ultraestrutura dos COCs e sobre a expansão das células do *cumulus*.

5 - MATERIAL E MÉTODOS

Essa pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA) do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu – S.P.

5.1 - Coleta e manipulação dos ovários e oócitos:

Foram utilizados ovários de ovinos provenientes dos frigoríficos: DOM PIG, situado no município de São Manuel – S.P. (a distância de 21,5 km do laboratório); MARFRIG, situado no município de Promissão - S.P. (a distância de 218 km); e COWPIG, situado no município de Boituva – S.P. (a distância de 117 km). Estes ovários foram obtidos de animais com idade, estado sanitário, condição nutricional e escore corporal desconhecidos. O tempo de transporte do frigorífico até o laboratório variou de 30 minutos a 2 horas, de tal maneira que, o intervalo de tempo entre a coleta dos ovários, nos frigoríficos, e a recuperação dos COCs, no laboratório, variou de 4 a 6 horas, dependendo da localização e do esquema de abate dos animais no frigorífico no qual o material foi obtido.

Imediatamente após a coleta, durante o abate, os ovários foram acondicionados em garrafas térmicas contendo solução fisiológica (NaCl 0,9%) a 35°C (MORTON et al., 2008), e transportados até o laboratório, onde foram lavados (Fig.1-A) com solução da mesma natureza química e condições físicas, na qual permaneceram durante todo o processo de aspiração folicular.

Para obtenção dos COCs, todos os folículos visíveis foram aspirados com auxílio de agulha 30 X 8 (20 G) (BD Precision Glide®) acoplada a seringa de 10 mL (BD Platipak™) (Fig.1-B) contendo 0,5 mL de TCM 199 Hepes (meio de cultivo de tecidos 199 tamponado com HEPES), suplementado com 50 UI/mL de heparina (SHIRAZI & SADEGHI, 2007). Este meio de cultivo foi pré-aquecido em estufa (CO₂ water jacketed incubator modelo 3110, Forma Scientific®) a 38,5°C e atmosfera com 5% de CO₂. Os COCs juntamente com o fluido folicular foram depositados em tubos cônicos de 15 mL (tipo falcon) e mantidos em banho-maria a 35°C (Fig.1-C,D). Em seguida, foram transferidos para placas de petri (96 X 21 mm) mantidas sobre placa aquecedora

(Eletrovet®) a 35°C, para posterior visualização e seleção dos COCs em estereomicroscópio (Olympus SZ51®).

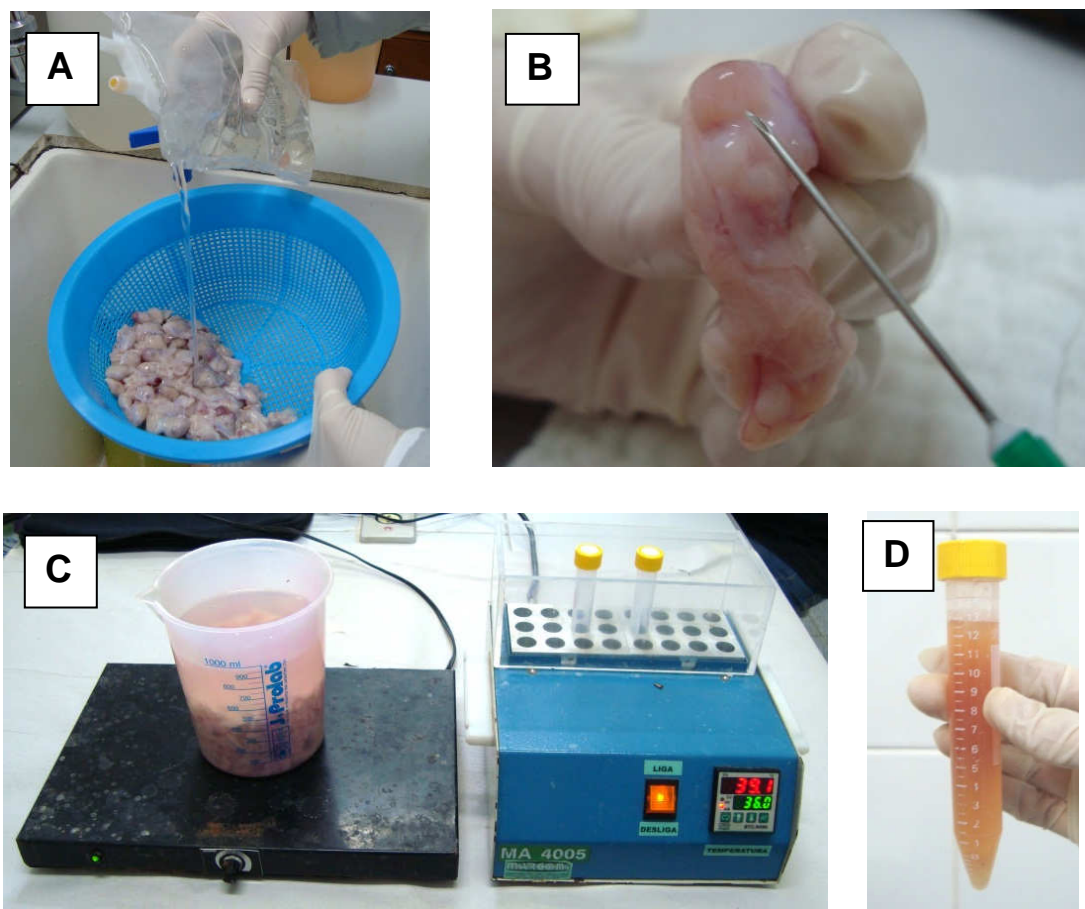


Figura 1: (A) Lavagem dos ovários de ovelha com solução fisiológica a 35 °C; (B) Aspiração folicular dos ovários de ovelha; (C) Controle da temperatura em 35°C para os ovários e fluido folicular, (D) Aspecto do fluido folicular contendo os COCs no tubo falcon.

5.2 - Classificação e seleção dos COCs:

Sob estereomicroscópio (Olympus SZ51®) (Fig. 2), os COCs foram analisados quanto às características das células do *cumulus* e ooplasma, e classificados de acordo com Morton et al.,(2005) em (Fig. 3):

Grau1 – mais que três camadas compactas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo e uniformemente granuloso;

Grau 2 – duas a três camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo e uniformemente granuloso;

Grau 3 – uma camada incompleta de células do *cumulus* ou poucas células do *cumulus*, e citoplasma homogêneo.

Foram selecionados para o experimento apenas COCs grau 1 e 2 que, de acordo com Baldassarre et al. (2003), são considerados COCs de boa qualidade. Oócitos desprovidos de células do *cumulus* (desnudos), com *cumulus* expandido, com alterações morfológicas no ooplasma (vacúolos) e na zona pelúcida ou com ooplasmas heterogêneo foram descartados.



Figura 2: Estereomicroscópio (Olympus SZ51) utilizado para visualização e seleção dos COCs; e placa aquecedora para controle da temperatura em 35°C para os COCs.

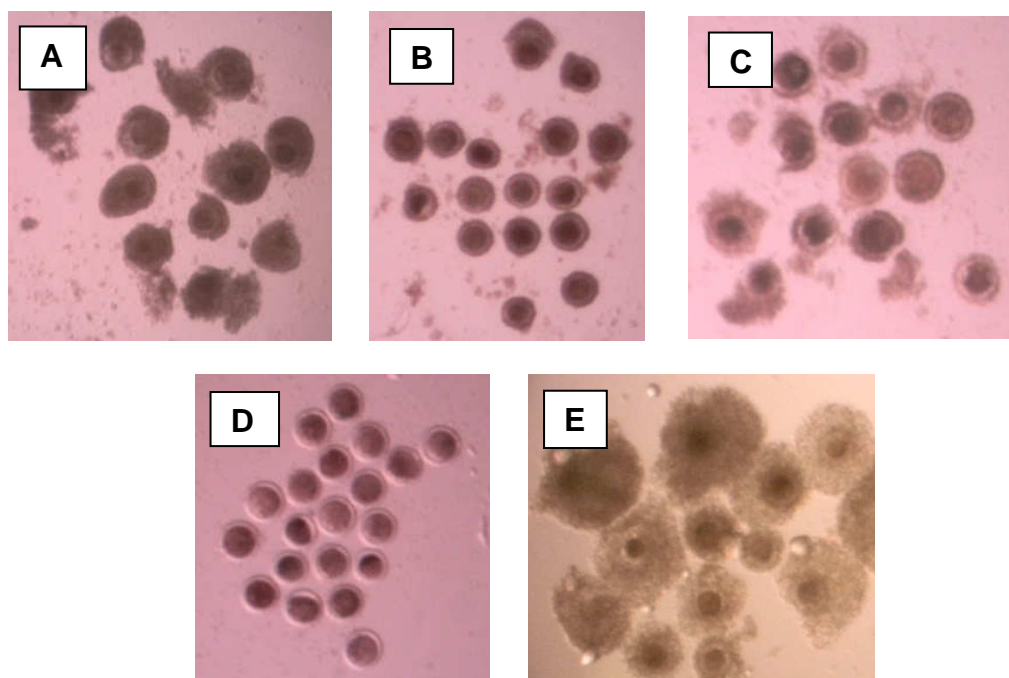


Figura 3: Micrografia dos COCs de ovelhas agrupados em diferentes graus de acordo com as características das células do *cumulus* e do ooplasma (MORTON et al., 2005):(A) GRAU 1; (B) GRAU 2; (C) GRAU3; (D) Oócitos desnudos; (E) COCs com *cumulus* expandido (Aumento 30X).

Durante o processo de seleção, os COCs foram lavados por 5 vezes em gotas de TCM-199 tamponado com Hepes, para remoção de debris celulares. Após a classificação, seleção e lavagem, os COCs foram transferidos para gotas de 90 μ L de meio de maturação padrão (Grupo Controle) suplementado com os fármacos em estudo (Grupos Tratamentos). Estas gotas foram mantidas em placas de petri (60 x 16 mm), sob óleo mineral. O número de COCs por gota variou de acordo com a eficiência de recuperação em cada rotina. De maneira geral, em torno de 20 a 25 COCs foram transferidos por gota e cultivados por 24 ou 46 horas em estufa a 38,5°C e atmosfera com 5% de CO₂. O meio de maturação considerado neste experimento como padrão consistiu do TCM-199 com sais de Earl acrescido de 0,1 UI/mL de FSH; 0,1UI/mL de LH; 0,3mM de piruvato de sódio; 75 μ g/mL de penicilina/estreptomicina; 10% de SFB; e 100 μ M de cisteamina. Os códigos e marcas dos constam no ANEXO I.

5.3 - Delineamento experimental:

Dada a impossibilidade da realização simultânea de todas as observações e tratamentos, devido à baixa disponibilidade de ovários de ovinos e à baixa taxa de recuperação de COCs grau 1 e 2, essa pesquisa foi dividida em etapas, cada uma com um número variável de rotinas.

Cada rotina consistiu de um Grupo Controle, considerado padrão para comparação e um Grupo Tratamento, no qual os COCs foram submetidos à ação de um dos fármacos inibidores da meiose (roscovitina ou ciclohexemida). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com número variável de repetições, de acordo com a disponibilidade de COCs em cada rotina.

Devido à impossibilidade de avaliar, no mesmo oócito, o bloqueio meiótico e sua reversibilidade, as primeiras rotinas foram interrompidas com 24 horas de cultivo *in vitro*, para avaliação do potencial de inibição meiótica dos fármacos em estudo. Para avaliação da reversibilidade deste bloqueio meiótico, outras rotinas foram realizadas e os COCs foram avaliados após 46 horas de cultivo *in vitro*. Rotinas independentes também foram necessárias para avaliação da maturação nuclear, em microscopia de fluorescência, e da maturação citoplasmática, em microscopia eletrônica de transmissão. Os

fármacos também foram avaliados em rotinas independentes, por isso cada rotina conteve um Grupo Controle para possibilitar a comparação. O grau de expansão das células do *cumulus* de todos os COCs de cada grupo experimental foi avaliado em todas as rotinas, após 24 e 46 horas de cultivo *in vitro*, antes de serem processados para avaliação da maturação nuclear e citoplasmática. A representação esquemática do Delineamento Experimental (Etapas I, II e III) consta no ANEXO II.

5.4 – Maturação oocitária:

Dos COCs selecionados, foi separada uma amostra para avaliação do estadio de maturação, nuclear e citoplasmática, no qual se encontravam antes de serem submetidos ao processo de maturação oocitária *in vitro*. Essa avaliação foi considerada como Etapa I, realizada em 20 rotinas, totalizando 396 oócitos, dos quais 296 foram utilizados para avaliação da maturação nuclear e 100 para avaliação da maturação citoplasmática.

5.4.a - Inibição da maturação nuclear oocitária *in vitro*:

A ação das drogas no processo de inibição da progressão da maturação nuclear oocitária foi verificada na Etapa II, realizada em dois experimentos. Cada experimento envolveu dois tratamentos, sendo um Grupo Controle e um Grupo Tratamento com um fármaco em teste.

No Grupo Controle, os COCs foram cultivados em meio de maturação padrão conforme descrito no item 5.2. No Grupo Tratamento denominado Roscovitina, ao meio de maturação padrão foi adicionado roscovitina na concentração de 100 μM . No Grupo Tratamento denominado Ciclohexemida, ao meio de maturação padrão foi adicionado ciclohexemida na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$.

A roscovitina foi preparada com solução estoque a 1g/L em dimetilsulfóxido e armazenado em alíquotas a -20°C até o uso. A ciclohexemida foi preparada com solução estoque a 20 mg/L em TCM-199, armazenado em alíquotas a -20°C até o uso. As concentrações dos fármacos em estudo foram determinadas de acordo com as informações da literatura (FULKA et al., 1986; MERMILLOD et al., 2000; ALBARRACÍN et al., 2005; HAN et al., 2006) e ensaios prévios.

No primeiro experimento da Etapa II foi estudado o potencial de ação da roscovitina. Essa etapa consistiu em 10 rotinas totalizando 487 COCs. Destes, 242 foram mantidos como Grupo Controle, sendo 142 para avaliação da maturação nuclear e 100 para maturação citoplasmática. Para o Grupo Tratamento com roscovitina foram utilizados 245 COCs, dos quais 145 foram para a avaliação da maturação nuclear e 100 para a maturação citoplasmática.

No segundo experimento da Etapa II foi estudado o potencial de ação da ciclohexemida. Essa etapa consistiu de 10 rotinas totalizando 418 COCs. Destes 192 foram mantidos no Grupo Controle, sendo 92 para avaliação da maturação nuclear e 100 para a maturação citoplasmática. Para o Grupo Tratamento com ciclohexemida foram utilizados 226 COCs, sendo 126 para a avaliação nuclear e 100 para avaliação citoplasmática.

5.4.b – Retomada da maturação nuclear oocitária *in vitro*

Visando o reinício da maturação nuclear, os COCs dos Grupos tratamentos foram lavados 7 vezes em TCM-199 Hepes para total remoção dos fármacos inibidores da meiose e, posteriormente, foram cultivados no meio de maturação padrão já descrito anteriormente no item 5.2 por mais 22 horas a 38,5 °C em atmosfera com 5% de CO₂, totalizando 46 horas de cultivo *in vitro*. Os COCs do Grupo Controle não foram lavados, apenas foram transferidos para novas gotas de meio de maturação padrão onde foram mantidos nas mesmas condições dos outros COCs.

A reversibilidade da inibição meiótica foi verificada na Etapa III, realizada em dois experimentos. Cada experimento envolveu dois tratamentos, sendo um Grupo Controle e um Grupo Tratamento com um dos fármacos em teste.

No primeiro experimento da Etapa III foi verificada a reversibilidade da inibição meiótica dos oócitos tratados com roscovitina. Foram realizadas 10 rotinas totalizando 498 COCs. Destes, 248 foram submetidos ao Grupo Controle, sendo 148 para a avaliação da maturação nuclear e 100 para a maturação citoplasmática. No Grupo Tratamento com roscovitina foram utilizados 250 COCs, sendo 150 para a avaliação da maturação nuclear e 100 para a maturação citoplasmática.

No segundo experimento da Etapa III foi verificada a reversibilidade do retardo meiótico dos oócitos tratados com ciclohexemida. Foram realizadas 10

rotinas totalizando 411 COCs. Destes, 206 foram submetidos ao Grupo Controle, sendo 106 para a avaliação da maturação nuclear e 100 para a maturação citoplasmática. No Grupo Tratamento com ciclohexemida foram utilizados 205 COCs, sendo 105 para a avaliação da maturação nuclear e 100 para a maturação citoplasmática.

5.5 - Avaliação da maturação oocitária *in vitro*:

5.5.a-Avaliação da expansão das células do *cumulus*:

Antes e após 24 e 46 horas de maturação oocitária *in vitro*, os COCs foram avaliados, sob estereomicroscópio (Olympus SZ51®), quanto ao grau de expansão das células do *cumulus*, classificados e quantificados em 3 categorias: expansão total das células do *cumulus* (Fig.4); expansão parcial do *cumulus* e ausência de expansão do *cumulus* (Fig.4). Esta avaliação visou examinar o efeito dos fármacos inibidores da meiose (roscovitina e ciclohexemida) sobre as células do *cumulus* e a relação entre a expansão do *cumulus* e o retardo meiótico.

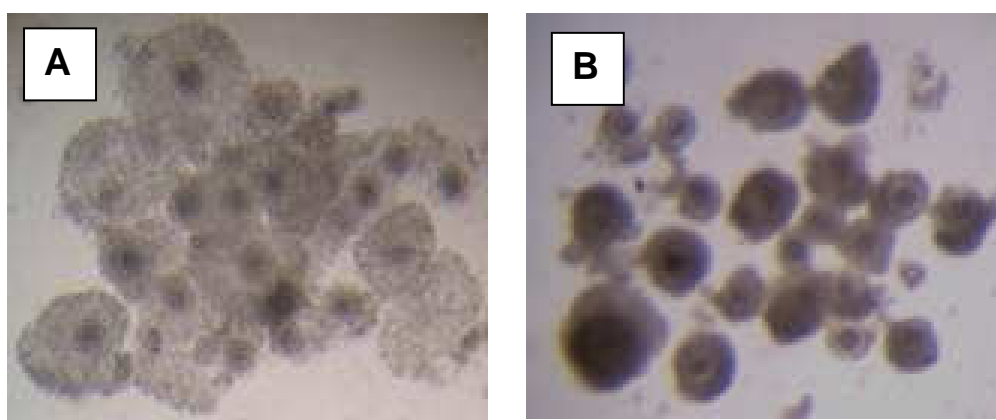


Figura 4: Micrografia do aspecto e expansão das células do *cumulus* de COCs de ovinos: **A:** expansão total das células do *cumulus*; **B:** ausência de expansão das células do *cumulus* (Aumento 30X).

5.5.b - Avaliação da maturação nuclear

Para determinação do estadio de maturação nuclear, os COCs foram desnudos em TCM 199 Hepes com auxílio de uma pipeta plástica de 50 uL. Os oócitos desnudos foram corados, colocando-se 5 oócitos por gota de 5 uL do corante bisbenzimidida (Hoechst 33342), em lâmina histológica coberta com lamínula e examinados em microscópio Leica® DMIRB equipado com luz

fluorescente ultra-violeta (filtro 350 e 461nm, excitação e emissão, respectivamente) (Fig.5 F).

De acordo com a configuração cromossômica, os oócitos foram quantificados e classificados em diferentes estádios (MA et al., 2003) (Fig.5):

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

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

- **Metáfase I (MI)**: em que os cromossomos estavam 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.

Os estádios de **anáfase I**, na qual os cromossomos homólogos estão se separando e há fuso visível, e **telófase I**, no qual os cromossomos estão separados, foram considerados no **estádio de metáfase II**, porque são estádios intermediários de um processo dinâmico, o que dificulta sua individualização. Foram considerados maturados aqueles oócitos que apresentaram configuração nuclear em metáfase II. Os oócitos cuja estrutura nuclear estava alterada, sem padrão de apresentação foram classificados como degenerados ou não identificados (Fig.5).

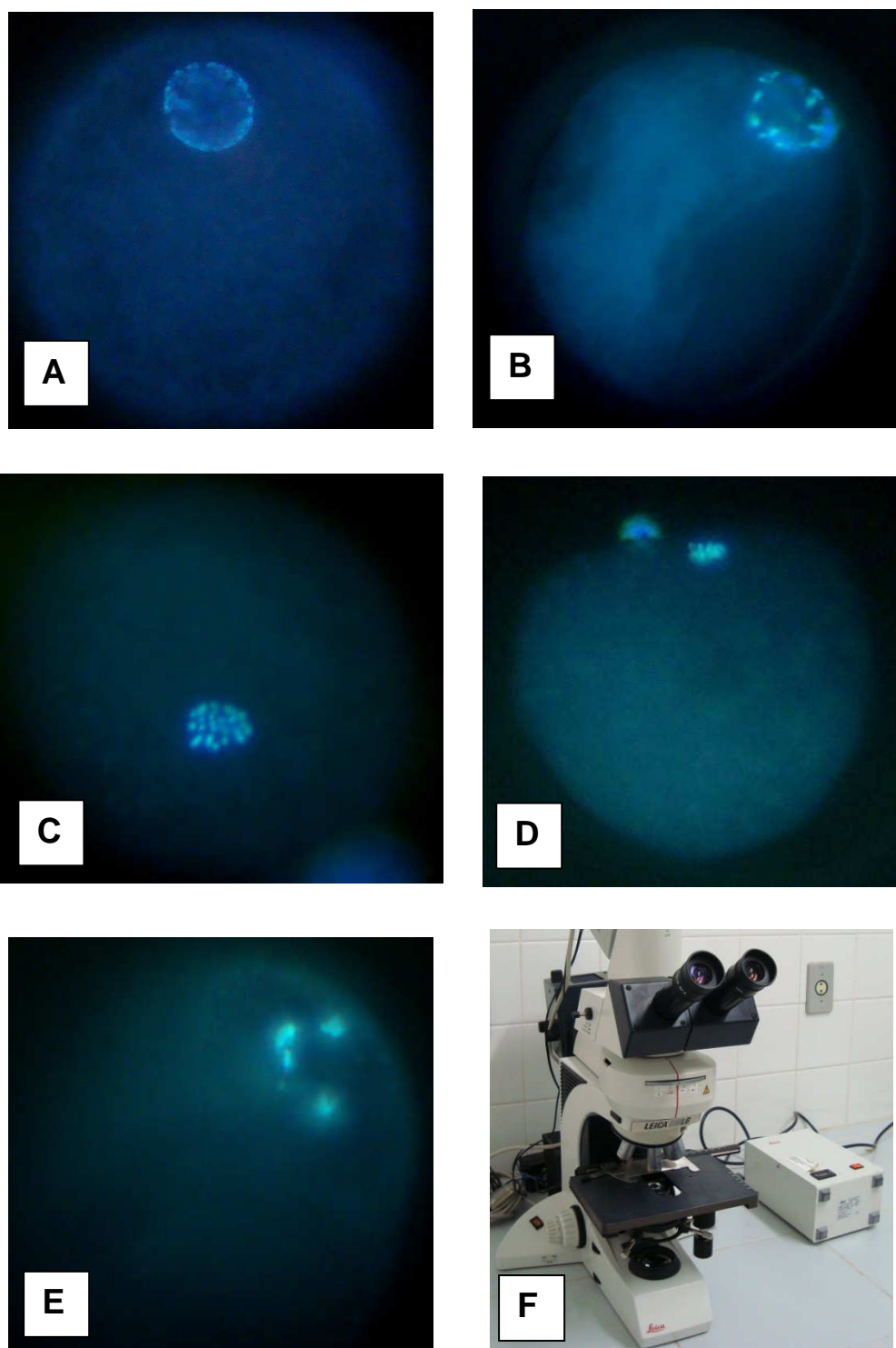


Figura 5: Micrografia: configurações cromossômicas da meiose em oócitos corados com bisbenzimidazol (Hoechst 33342) e analisados em microscopia de fluorescência: vesícula germinativa (A); quebra de vesícula germinativa (B); metáfase I (C); metáfase II (D); degenerado ou não identificado (E) (Aumento 200X). (F) Microscópio invertido Leica equipado com epifluorescência utilizado para a visualização dos oócitos corados com Hoechst 33342.

5.5.c - Avaliação da maturação citoplasmática

A análise ultra-estrutural dos oócitos para determinação da maturação citoplasmática foi realizada pelo centro de microscopia eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu. As amostras de 100 COCs, em média, em cada grupo experimental, foram fixadas em glutaraldeído 2,5 % em 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,4) por 24 horas e depois novamente fixadas em tetróxido de ósmio, no mesmo tampão. Após desidratação em uma série crescente de acetona (70%, 90% e 100%), as amostras foram incluídas em blocos de resina Epon. Após a inclusão, as amostras permaneceram por 3 a 4 dias em estufa a 60°C para polimerização.

Os blocos foram submetidos à ultramicrotomia, e os cortes semifinos (1-2 µm) foram corados em azul de toluidina para triagem do material antes da visualização em microscópio eletrônico. Após esta triagem, cortes ultrafinos foram realizados com lâmina de diamante, montados em grades de cobre e corados com acetato de urânio e citrato de chumbo. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 100 e fotografadas. Conforme o corte das amostras, dos 100 COCs de cada grupo experimental, foram obtidas imagens de alguns COCs apenas, sendo, em média, 4 a 6 COCs por grupo experimental.

As imagens obtidas dos complexos *cumulus*-oophorus foram avaliadas quanto ao padrão de distribuição das organelas citoplasmáticas, que caracteriza a maturação citoplasmática, e quanto às características das células do *cumulus*, que estão diretamente relacionadas à maturação oocitária, e classificadas de acordo com o descrito por Hyttel et al. (1989, 1986, 1997) em:

- **COC imaturo:** ausência ou presença de um pequeno espaço perivitelínico; membrana plasmática com pequenas microvilosidades paralelas ou incorporadas à zona pelúcida; presença do Complexo de Golgi bem desenvolvido com múltiplas vesículas dilatadas; retículo endoplasmático bem desenvolvido distribuído uniformemente por todo ooplasma; aglomerados de mitocôndrias distribuídas principalmente na periferia do oócito; grande quantidade de vesículas bem dilatadas e arredondadas e de gotículas de lipídeo uniformemente distribuídas pelo ooplasma; aglomerados de grânulos corticais distribuídos por todo ooplasma; ausência de expansão das células do *cumulus*; presença de

prolongamentos/projeções citoplasmáticos das células do *cumulus* que penetram na zona pelúcida e se comunicam com a membrana plasmática do oócito através das junções “gap” comunicantes.

- **COC maduro:** presença do espaço perivitelínico mais desenvolvido; membrana plasmática com microvilosidades menores e eretas; complexo de Golgi pequeno e/ou não identificado (praticamente ausente); retículo endoplasmático diminui de tamanho e se aglomera próximo a membrana plasmática; grande quantidade de mitocôndrias localizadas principalmente na região central do oócito; grande quantidade de vesículas e gotículas de lipídeos associadas às mitocôndrias e localizadas mais centralmente no ooplasma; grânulos corticais isolados e alinhados próximos à face interna da membrana plasmática, formando uma monocamada estratégica para impedir a poliespermia; expansão das células do *cumulus*; retração dos prolongamentos das células do *cumulus* e disjunção das junções comunicantes.

5.6- Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância segundo delineamento inteiramente casualizado e as médias comparadas pelo teste de Scheffé a 5% de probabilidade, em acordo com as exigências do modelo matemático da análise de variância (GOMES, 1970).

6 - RESULTADOS

6.1-ETAPA I-Condição prévia dos COCs: Avaliação do estadio de maturação, nuclear e citoplasmática, e da expansão das células do *cumulus* logo após a coleta dos COCs visando estabelecer um padrão de referência para posterior comparação com os resultados obtidos após o cultivo *in vitro* na presença e ausência da roscovitina ou ciclohexemida.

6.1.a - Avaliação da expansão do *cumulus*

Todos os 396 COCs selecionados para avaliação da maturação nuclear e citoplasmática antes de serem submetidos ao cultivo *in vitro* apresentavam pelo menos uma camada de células do *cumulus* compacta e ooplasma homogêneo ou uniformemente granuloso. Ou seja, apenas COCs classificados como Grau 1 e 2, de acordo com Morton et al., (2005), foram selecionados para este estudo.

6.1.b - Avaliação da maturação nuclear

De acordo com os resultados apresentados na tabela 1, a maioria dos oócitos avaliados quanto ao estadio de maturação nuclear, em microscópio de fluorescência, antes de serem submetidos ao cultivo *in vitro* estavam em estadio de QVG (83,11%), enquanto apenas 3,72% estavam em VG. Também se constata porcentagem relativamente baixa de oócitos degenerados ou não identificados (10,81%) e apenas 1,35% e 1,01% em M I e II, respectivamente.

TABELA 1- Estádios da maturação nuclear (MN) nos oócitos avaliados antes do cultivo *in vitro*.

GRUPO	COCs avaliados (n)	COCs (%) em cada estágio de MN				
		VG	QVG	MI	MII	Deg. / N.I.
Condições prévias	296	3,72	83,11	1,35	1,01	10,81

VG = vesícula germinativa; QVG = quebra de vesícula germinativa; MI = metáfase I; MII = metáfase II, DEG/ N.I. = degenerado ou não identificado

6.1.c – Avaliação da maturação citoplasmática

A análise ultraestrutural dos COCs selecionados para avaliação do estadió de maturação antes de serem submetidos ao cultivo *in vitro* revelou características de imaturidade, conforme descrito por Hyttel et al. (1986, 1989 e 1997), como: presença de várias camadas de células do *cumulus* compactas, ou seja, ausência de expansão do *cumulus* (Fig.6-A); presença de prolongamentos citoplasmáticos das células do *cumulus* que atravessam a zona pelúcida e adentram em invaginações da membrana plasmática do oócito com a qual estabelecem comunicação através de complexos juncionais constituídos por junções comunicantes e adesivas (Fig.6-A,B,C.); espaço perivitelínico pouco desenvolvido (Fig.6-A); membrana plasmática do oócito com poucas e pequenas microvilosidades (Fig.6-A,D,F); presença de aglomerados de mitocôndrias pleomórficas, localizados principalmente na periferia do oócito, com um pequeno número distribuído uniformemente por todo ooplasma. As mitocôndrias apresentavam poucas cristas paralelas e aspecto circular, alongado, formato de ferradura ou com projeções em forma de arco, conforme o corte das amostras (Fig.6-D, E,F). Associado às mitocôndrias, foi observada grande quantidade de retículo endoplasmático bem desenvolvido e de grânulos de lipídeo, constituindo as denominadas unidades funcionais ou unidades metabólicas descritas por Kruip et al. (1983) (Fig.6-D). Também foram encontrados: grande quantidade de retículo endoplasmático e grânulos de lipídeo dispersos por todo ooplasma (Fig.6-E); complexos de Golgi bem desenvolvidos, constituídos por várias cisternas sobrepostas associadas a várias e pequenas vesículas, e localizados principalmente na periferia do oócito; pouca quantidade de grânulos corticais, esféricos e com tamanho e coloração heterogêneos, organizados em grumos e dispersos por todo ooplasma, estando mais concentrados na região cortical do oócito e em associação aos complexos de golgi (Fig.6-F); pouca quantidade de vesículas electrón-lucentes; presença de algumas figuras mielínicas, que correspondem aos grânulos de lipídeos com conteúdo membranoso no seu interior (Fig.6-E), e pequenas vesículas cobertas.

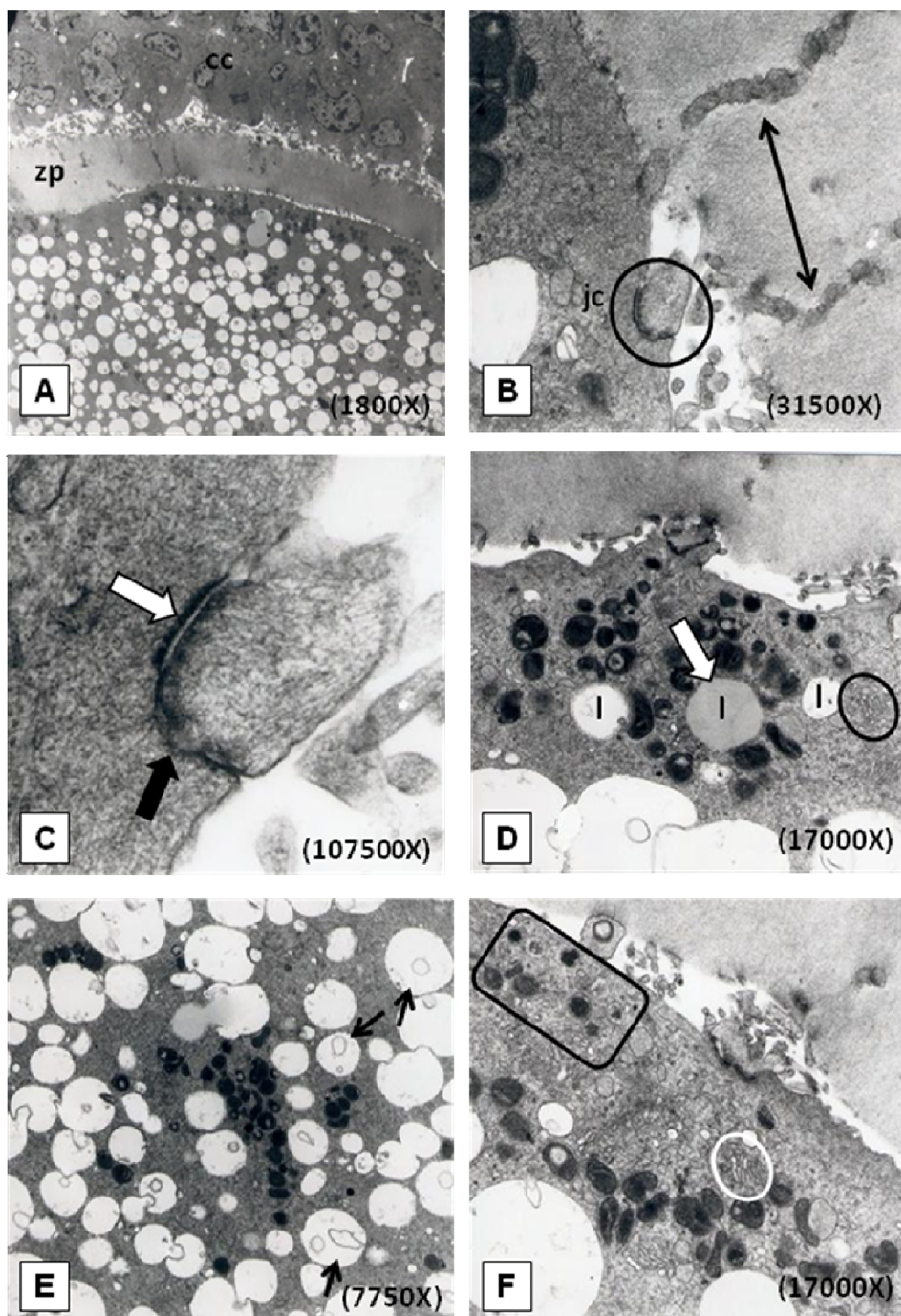


Figura 6- Características ultraestruturais de COCs ovinos imaturos: (A) células do *cumulus* (cc) compactas, espaço perivitelínico pequeno; e aspecto geral do ooplasma; (1800X); (B) prolongamentos das células do *cumulus* (seta negra) e complexos juncionais (jc) (círculo negro) (31500X); (C) complexos juncionais: junções gap comunicantes (seta branca) e junções adesivas (seta negra) (107500X); (D) mitocôndrias pleomórficas aglomeradas, grânulos de lipídeo (l), unidade metabólica (seta branca), complexo de Golgi (círculo negro) (17000X); (E) grânulos de lipídeo, aglomerado de mitocôndrias e de grânulos corticais, figuras mielínicas (seta negra) (7750X); (F) grumos de grânulos corticais (quadrado negro), complexo de Golgi (círculo branco) (17000X).

6.2 – ETAPA II – Inibição Meiótica Oocitária

6.2.a - Roscovitina (Etapa II - primeiro experimento):

Avaliação do potencial da roscovitina em retardar a meiose oocitária sem afetar a progressão da maturação citoplasmática.

6.2.a.1- Avaliação da expansão do *cumulus*

A avaliação visual da expansão das células do *cumulus*, sob estereomicroscópio, revelou que 89,5% dos COCs cultivados *in vitro* por 24 horas na presença de 100 μ M de roscovitina não apresentaram expansão das células do *cumulus*, enquanto apenas 10,5% apresentaram expansão parcial e nenhum COC teve expansão total. Já no controle, significativa porcentagem de COCs (74,27%) estava com expansão total do *cumulus*, enquanto apenas 17,59% apresentaram expansão parcial e 8,14% ausência de expansão (Tab.2).

TABELA 2. Efeito do cultivo *in vitro* por 24 horas em meio de maturação padrão (Grupo Controle) acrescido de 100 μ M de roscovitina sobre a expansão das células do *cumulus* de COCs de ovinos.

GRUPO	COCs avaliados (n)	COCs (%) com Expansão		
		Total	Parcial	Ausente
Controle	307	74,27	17,59	8,14
Roscovitina	381	0,0	10,50	89,50

6.2.a.2- Avaliação da maturação nuclear

A avaliação da maturação nuclear oocitária, em microscópio de fluorescência, revelou que o cultivo *in vitro* dos COCs de ovinos por 24 horas na presença de 100 μ M de roscovitina retardou a meiose em 53,1% dos oócitos avaliados, sendo que 15,86 % permaneceram em QVG e 37,24% em MI. No entanto, também foi constatada elevada porcentagem de oócitos em MII (23,45%) e oócitos degenerados ou não identificados (23,45%). Já no grupo controle, houve adequada progressão da maturação nuclear, sendo que 79,58% dos oócitos analisados atingiram o estadio de metáfase II, enquanto

apenas 7,75% e 4,93% estavam em QVG e MI, respectivamente. A porcentagem de oócitos classificados como degenerados ou não identificados (7,75%) foi relativamente baixa e estava dentro do esperado (Tab.3).

TABELA 3. Estádios da maturação nuclear (MN) de oócitos de ovinos cultivados *in vitro* por 24 horas em meio de maturação padrão (grupo controle) suplementado com 100 µM roscovitina.

GRUPO	COCs avaliados (n)	COCs (%) em cada estádio de MN				
		VG	QVG	MI	MII	Deg. / N.I.
Controle	142	0,0	7,75	4,93	79,58	7,75
Roscovitina	145	0,0	15,86	37,24	23,45	23,45

VG = vesícula germinativa; QVG = quebra de vesícula germinativa; MI = metáfase I; MII = metáfase II, DEG/ N.I. = degenerado ou não identificado.

6.2.a.3- Avaliação da maturação citoplasmática

- COCs do grupo controle

A análise ultraestrutural dos COCs após 24 horas de cultivo *in vitro* em meio de maturação padrão (item 5.2) isento de inibidores da meiose revelou características de maturidade, conforme descrito por Hyttel et al. (1986, 1989 e 1997), como: expansão total das células do *cumulus*, com perda substancial da quantidade de células (Fig.7-A); retração dos prolongamentos das células do *cumulus*, alguns destes visíveis no espaço perivitelínico, e disjunção dos complexos juncionais (Fig.7-A); espaço perivitelínico mais desenvolvido (Fig.7-B); membrana plasmática do oócito com grande quantidade de microvilosidades (Fig.7-B); grande quantidade de mitocôndrias pleomórficas distribuídas uniformemente por todo ooplasma. As mitocôndrias apresentavam poucas cristas paralelas e aspecto circular, alongado, formato de ferradura ou com projeções em forma de arco, conforme o corte das amostras, do mesmo modo como observado nos oócitos imaturos (Fig.7-C). Também foi observado: menor quantidade de grânulos de lipídeo e maior quantidade de vesículas elétron-lucentes, ambas as estruturas uniformemente distribuídas por todo ooplasma (Fig.7-C.); aumento do número de figuras mielínicas (Fig.7-C.); presença de retículo endoplasmático tanto associado às mitocôndrias e aos

grânulos de lipídeos como disperso no ooplasma; redução substancial dos complexos de golgi em termos de quantidade e tamanho; e grande quantidade de grânulos corticais, ainda com aspecto heterogêneo quanto ao tamanho e coloração, porém com eletrodensidade mais homogênea que no imaturo, isolados e alinhados próximos à face interna da membrana plasmática do oócito, formando uma monocamada estratégica para impedir a poliespermia (Fig.7-B).

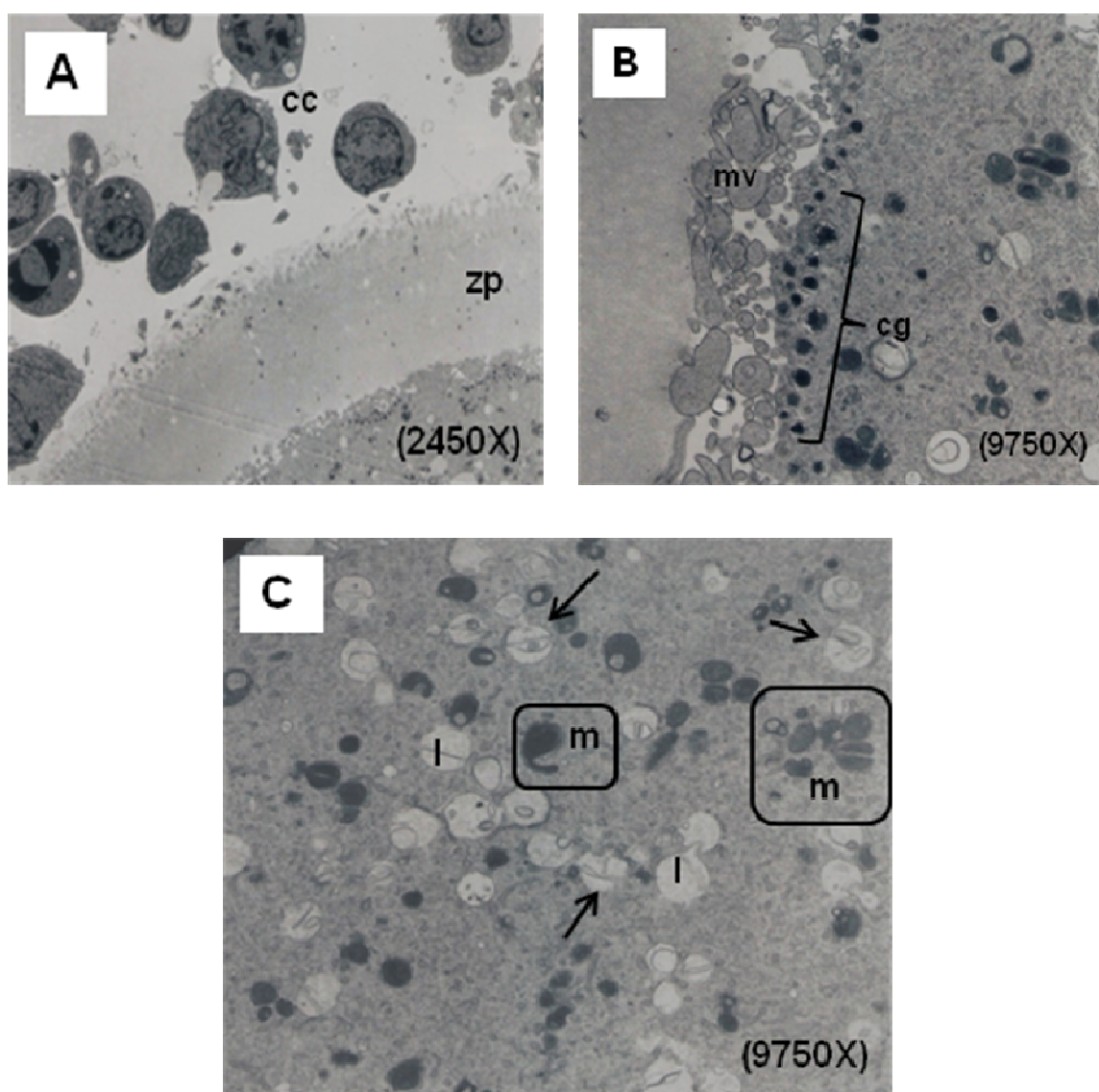


Figura 7- Características ultraestruturais de COCs de ovinos após 24 horas de maturação (controle): **(A)** expansão total das células do *cumulus* (cc), ausência dos prolongamentos citoplasmáticos das células do *cumulus* através da zona pelúcida (zp), e ausência dos complexos juncionais(2450X); **(B)** espaço perivitelínico bem desenvolvido, muitas microvilosidades (mv), figuras mielínicas, e grânulos corticais (cg) alinhados (9750X); **(C)** mitocôndrias (m) pleomórficas, grânulos de lipídeos (l) e figuras mielínicas (seta negra) (9750X).

- COCs tratados com Roscovitina

A análise ultraestrutural dos COCs após 24 horas de cultivo *in vitro* em meio de maturação padrão (item 5.2) suplementado com 100 μ M de roscovitina revelou características de maturidade e imaturidade como: pequena expansão das células do *cumulus* (Fig.8-A); retração dos prolongamentos das células do *cumulus* (Fig.8-A), alguns destes ainda visíveis no espaço perivitelínico (Fig.8-C); redução substancial do número de complexos juncionais (Fig.8-D); espaço perivitelínico bem desenvolvido (Fig.8-C); membrana plasmática do oócito com poucas microvilosidades (Fig.8-D); grande quantidade de mitocôndrias pleomórficas com menor eletrondensidade e com pontos enegrecidos, que correspondem a cristais, distribuídas uniformemente por todo ooplasma. As mitocôndrias apresentavam aspecto circular, alongado ou formato de ferradura, conforme o corte das amostras, do mesmo modo como observado nos oócitos imaturos e no grupo controle (Fig.8-C,D). Também foi observada grande quantidade de grânulos de lipídeos e de figuras mielínicas (Fig.9-B), e pouca quantidade de vesículas elétron-lucentes com conteúdo eletron-denso, uniformemente distribuídas pelo ooplasma; grande quantidade de retículo endoplasmático dilatado, tanto associado às mitocôndrias, quanto disperso pelo ooplasma (Fig.8-D); complexo de golgi ausente e poucos grânulos corticais, com eletrodensidade homogênea, isolados e alinhados com a membrana plasmática do oócito (Fig.8-C).

Sinais de degeneração (Fig.8-A) foram identificados nas células do *cumulus*, as quais apresentavam núcleo picnótico e características de apoptose celular. No entanto, o ooplasma e as organelas citoplasmáticas não apresentavam indícios de degeneração.

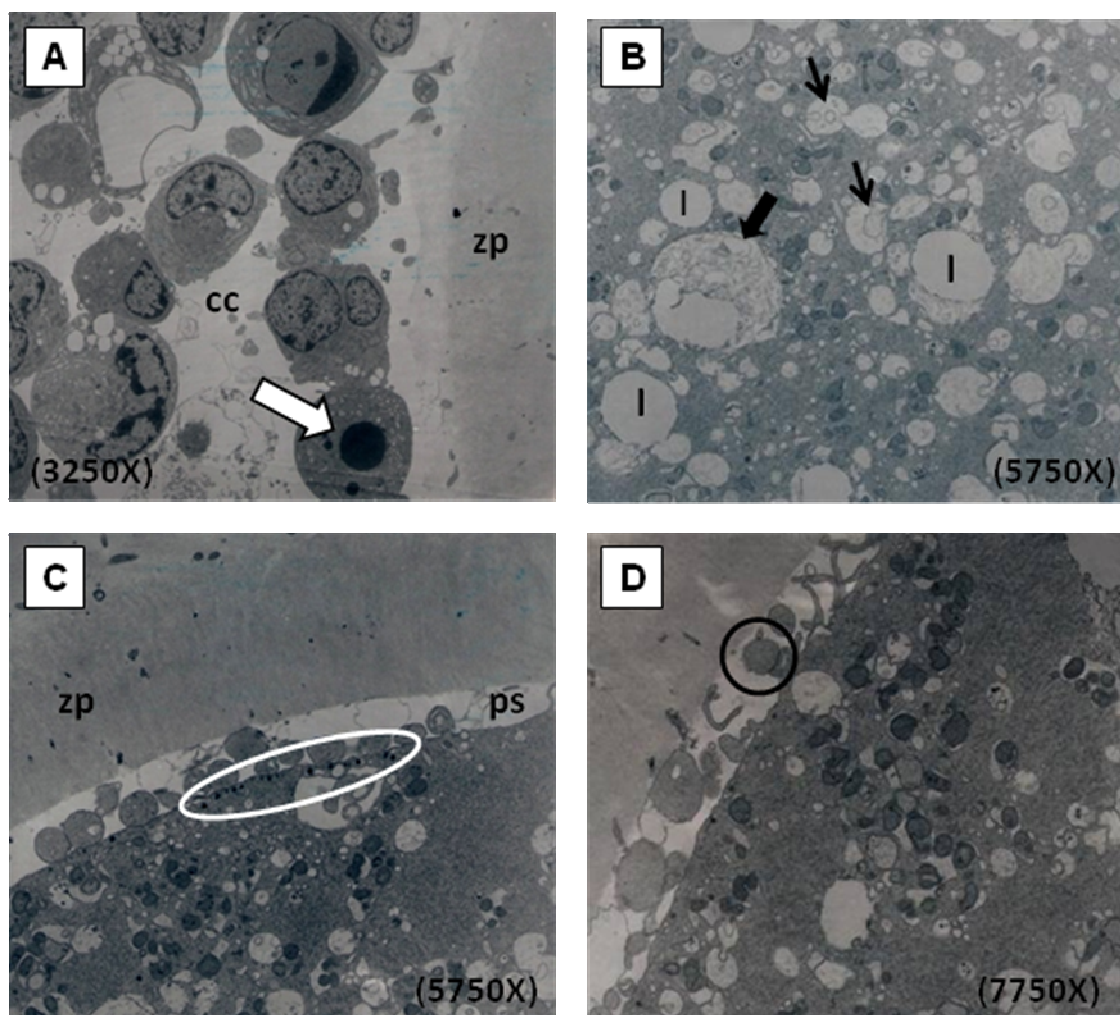


Figura 8- Características ultraestruturais de COCs ovinos após 24 horas de cultivo *in vitro* na presença de 100 μ M de roscovitina: **(A)** expansão parcial das células do *cumulus* (cc), sinais de degeneração como núcleo picnótico (seta branca), ausência prolongamentos citoplasmáticos das células do *cumulus* através da zona pelúcida (zp) (3250X); **(B)** aspecto geral do ooplasma, grânulos de lipídeos (l), figuras mielínicas (seta negra) (5750X); **(C)** espaço perivitelínico (ps) bem desenvolvido, mitocôndrias pleomórficas, grânulos corticais alinhados (círculo branco) (5750X); **(D)** poucas microvilosidades, poucos complexos junccionais (círculo negro); retículo endoplasmático dilatado, mitocôndrias pelomórficas (7750X).

6.2.b – Ciclohexemida (Etapa II - segundo experimento):

Avaliação do potencial da ciclohexemida em retardar a meiose oocitária, sem afetar a progressão da maturação citoplasmática.

6.2.b.1- Avaliação da expansão do *cumulus*

A avaliação visual da expansão das células do *cumulus*, sob estereomicroscópio, revelou que porcentagem significativa (55,58%) dos COCs cultivados *in vitro* por 24 horas na presença de 1µg/mL ciclohexemida, apresentou expansão parcial do *cumulus*, enquanto 18,75% não apresentaram expansão e 25,67% tiveram expansão total. Já no grupo controle, do mesmo modo como observado no item 6.2.a.1, a maioria dos COCs examinados (71,19%) estava com expansão total do *cumulus*, enquanto 22,44% apresentaram expansão parcial e 6,37% ausência de expansão (Tab.4).

TABELA 4. Efeito do cultivo *in vitro* por 24 horas em meio de maturação padrão (Grupo Controle) acrescido de 1µg/mL de ciclohexemida sobre a expansão das células do *cumulus* de COCs de ovinos.

GRUPO	COCs avaliados (n)	COCs (%) com Expansão		
		Total	Parcial	Ausente
Controle	361	71,19	22,44	6,37
Ciclohexemida	448	25,67	55,58	18,75

6.2.b.2- Avaliação da maturação nuclear

De acordo com os resultados apresentados na tabela 5, o cultivo *in vitro* de COCs ovinos, por 24 horas, na presença de 1µg/mL de ciclohexemida retardou a meiose em 89,69% dos oócitos avaliados, sendo que 5,56% e 84,13% permaneceram em QVG e MI, respectivamente, e nenhum oócito atingiu o estadio de MII. Conforme esperado, considerável porcentagem de oócitos foi classificada como degenerados ou não identificados (10,32%). Já no grupo Controle, do mesmo modo como constatado no item 6.2.a.2, houve adequada progressão da maturação nuclear, sendo que 80,43% dos oócitos

analisados atingiram o estadios de metáfase II e apenas 3,26% e 13,04% permaneceram em QVG e MI, respectivamente. Vale ressaltar ainda que apenas 3,26% dos oócitos foram classificados como degenerados ou não identificados.

TABELA 5. Estádios da maturação nuclear (MN) de oócitos de ovinos cultivados *in vitro* por 24 horas em meio de maturação padrão (grupo controle) suplementado com 1µg/mL de ciclohexemida.

GRUPO	COCs avaliados (n)	COCs (%) em cada estadios de MN				
		VG	QVG	MI	MII	Deg. / N.I.
Controle	92	0,0	3,26	13,04	80,43	3,26
Ciclohexemida	126	0,0	5,56	84,13	0,0	10,32

VG = vesícula germinativa; QVG = quebra de vesícula germinativa; MI = metáfase I; MII = metáfase II, DEG/ N.I. = degenerado ou não identificado.

6.2.b.3- Avaliação da maturação citoplasmática

- COCs do grupo controle

A análise ultraestrutural dos COCs cultivados *in vitro* por 24 horas em meio de maturação padrão (**item 5.2**) isento de inibidores da meiose revelou as mesmas características de maturidade observadas nos COCs do grupo controle do item **6.2.a.3**, correspondente ao primeiro experimento da Etapa II.

- COCs tratados com Ciclohexemida

A análise ultraestrutural dos COCs cultivados *in vitro* por 24 horas em meio de maturação padrão (**item 5.2**) suplementado com 1µg/mL de ciclohexemida revelou as mesmas características de maturidade observadas nos COCs do grupo controle do item **6.2.a.3**, correspondente ao primeiro experimento da Etapa II (Fig.9– A,B,C).

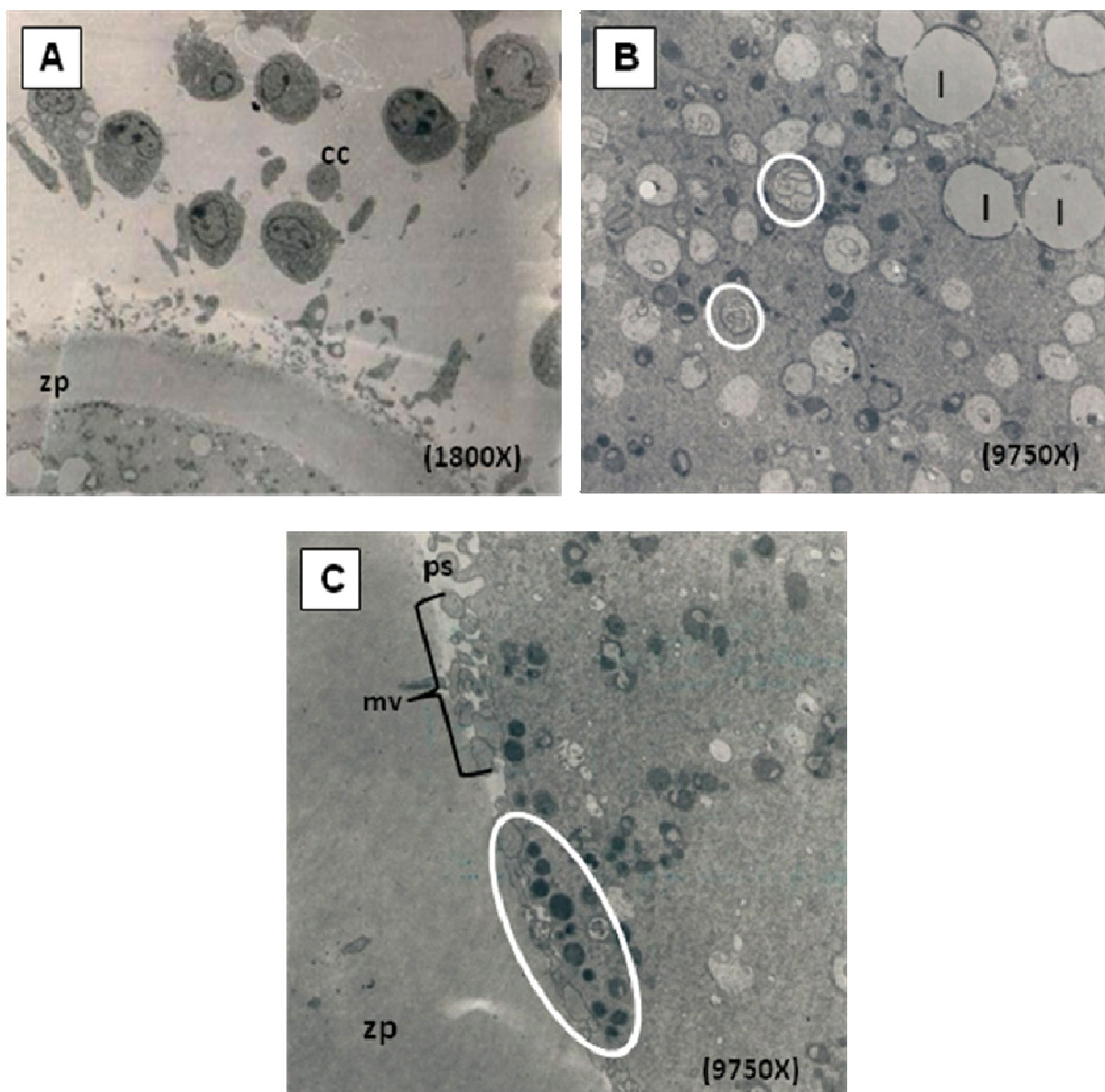


Figura 9 - Características ultraestruturais de COCs ovinos após 24 horas de cultivo *in vitro* na presença de 1µg/mL de ciclohexemida: (A) expansão total das células do *cumulus* (cc), ausência de prolongamentos das células do cumulus através da zona pelúcida (zp), ausência complexos juncionais (jc) (1800X); (B) mitocôndrias pleomórficas dispersas por todo ooplasma, poucos grânulos de lipídeos (l), muitas figuras mielínicas (círculo branco) (9750X); (C) espaço perivitelínico (ps) bem desenvolvido, muitas microvilosidades (mv), grânulos corticais alinhados à membrana do oócito (círculo branco) (9750X).

6.3. Etapa III – Reversibilidade da inibição meiótica

6.3.a Roscovitina (Etapa III - Primeiro experimento):

Avaliação da reversibilidade do bloqueio meiótico oocitário promovido pela roscovitina, caracterizada pelo reinício e continuidade das divisões meióticas concomitante com a progressão da maturação citoplasmática.

6.3.a.1- Avaliação da expansão do *cumulus*

De acordo com a tabela 6, a maioria COCs avaliados quanto à expansão das células do *cumulus*, após 46 horas de cultivo *in vitro*, sendo 24 horas em meio de maturação padrão (item 5.2) suplementado com 100 μ M de roscovitina e 22 horas na ausência deste fármaco, não apresentou expansão do *cumulus* (90,97%), sendo que somente 9,03% estavam com expansão parcial e nenhum COC apresentou expansão total do *cumulus*. Em contrapartida, no grupo controle, significativa porcentagem dos COCs examinados (90,31%) apresentou expansão total do *cumulus*, enquanto apenas 4,26% apresentaram expansão parcial e 5,43% ausência de expansão.

TABELA 6. Expansão das células do *cumulus* de COCs de ovinos após o cultivo *in vitro* por 24 horas na presença de 100 μ M de roscovitina seguido por mais 22 horas na ausência deste fármaco. Grupo Controle: cultivo *in vitro* por 46 horas em meio de maturação livre de fármacos inibidores da meiose.

GRUPO	COCs avaliados (n)	COCs (%) com expansão		
		Total	Parcial	Ausente
Controle	258	90,31	4,26	5,43
Roscovitina	299	0,0	9,03	90,97

6.3.a.2- Avaliação da maturação nuclear

O cultivo *in vitro* dos COCs de ovinos por 46 horas, sendo 24 horas na presença de 100 μ M de roscovitina, seguido por 22 horas na ausência deste fármaco (Tab.7), permitiu a reversibilidade do retardo meiótico promovido pela roscovitina e a progressão da maturação nuclear em 60% dos oócitos analisados, enquanto apenas 10% permaneceram em QVG e 12% em MI.

Nota-se, no entanto, que significativa porcentagem de oócitos foi classificada como degenerados ou não identificados (18%). Já no grupo controle, do mesmo modo como constatado nos grupos controle dos itens **6.2.a.2** e **6.2.b.2**, nos quais os COCs foram cultivados *in vitro* por 24 horas na ausência de fármacos, significativa porcentagem dos oócitos analisados (75,68%) estava em MII, enquanto apenas 1,35%, 7,43% e 6,08% permaneceram em VG, QVG e MI, respectivamente. Apesar de considerável, a taxa de oócitos degenerados ou não identificados (9,56%) estava dentro do esperado, uma vez que a exposição às condições de cultivo *in vitro* foi prolongada (Tab.7).

TABELA 7. Estádios de maturação nuclear (MN) de oócitos de ovinos cultivados por 24 horas na presença de 100 μ M de roscovitina e por mais 22 horas na ausência deste fármaco. Grupo Controle: cultivo *in vitro* por 46 horas em meio de maturação livre de fármacos inibidores da meiose.

GRUPO	COCs avaliados (n)	COCs (%) em cada estádio de MN				
		VG	QVG	MI	MII	Deg./N. I.
Controle	148	1,35	7,43	6,08	75,68	9,56
Roscovitina	150	0,0	10,0	12,0	60,0	18,0

VG = vesícula germinativa; QVG = quebra de vesícula germinativa; MI = metáfase I; MII = metáfase II, DEG/ N.I.= degenerado ou não identificado.

6.3.a.3- Avaliação da maturação citoplasmática

- COCs do Grupo controle:

A análise ultraestrutural dos COCs após 46 horas de cultivo *in vitro* em meio de maturação padrão (item 5.2) na ausência de inibidores da meiose revelou características de maturidade semelhantes às observadas nos COCs do grupo controle do item **6.2.a.3**, correspondente ao primeiro experimento da Etapa II, com a diferença que além da expansão total das células do *cumulus*, também houve dispersão e perda substancial do número destas células (Fig.10-A). Além disso, foram observados: apenas algumas figuras mielínicas dispersas pelo ooplasma (Fig.10-B); e retículo endoplasmático bem desenvolvido concentrado em algumas áreas do ooplasma e em associação com mitocôndrias e grânulos de lipídeo (Fig.10-B).

No entanto, estes oócitos também revelaram indícios de envelhecimento celular caracterizado por sinais de degeneração no ooplasma, como várias

áreas de ausência de matriz citoplasmática (Fig.10-C); e também nas células do *cumulus*, que apresentavam núcleo picnótico e outros sinais de apoptose celular.

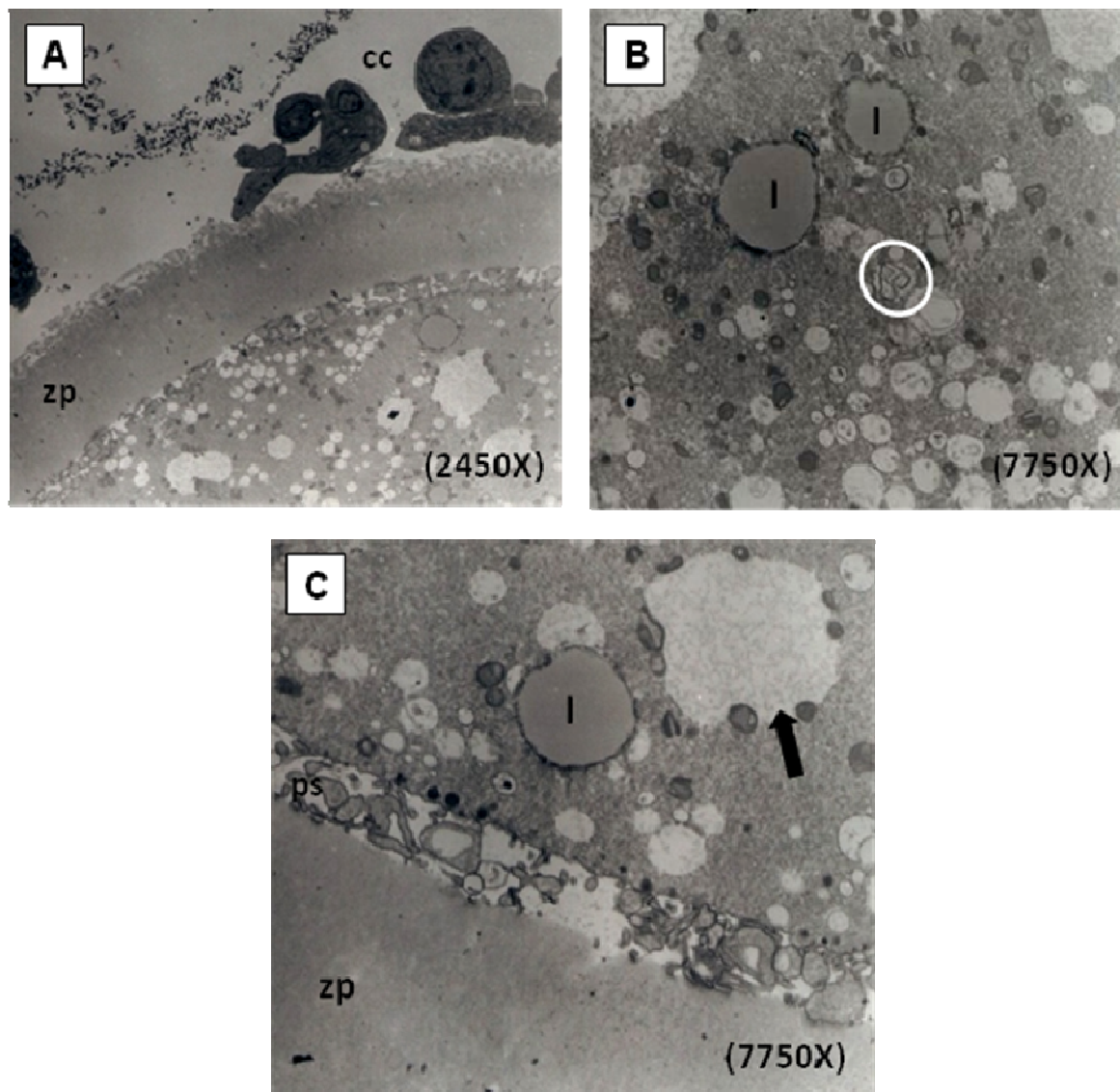


Figura 10 - Características ultraestruturais de COCs ovinos após 46 horas de cultivo *in vitro* (controle): (A) expansão, dispersão e perda das células do *cumulus* (cc) (2450X); (B) aspecto geral do ooplasma, mitocôndrias dispersas, grânulos de lipídeo (l), figuras mielínicas (círculo branco) (7750X); (C) espaço perivitelínico (ps) bem desenvolvido e muitas microvilosidades, grânulos corticais isolados e alinhados, área de vazio citoplasmático (seta negra) (7750X).

- COCs tratados com roscovitina

A análise ultraestrutural dos COCs após 46 horas de cultivo *in vitro*, sendo 24 horas na presença de 100 μM de roscovitina e 22 horas na ausência deste fármaco revelou características de maturidade e imaturidade semelhantes às observadas nos COCs tratados com roscovitina por 24 horas, que correspondem primeiro experimento da etapa II (item 6.2.a.3), com algumas diferenças como: expansão total e dispersão das células do *cumulus*, com perda substancial do número de células e maior quantidade de vesículas cobertas. No entanto, estes oócitos também revelaram indícios de envelhecimento celular caracterizado por sinais de degeneração no ooplasma, como várias áreas de ausência de matriz citoplasmática (Fig.11-A e B); e também nas células do *cumulus* que apresentavam núcleo picnótico e sinais de apoptose celular, do mesmo modo como constatado nos COCs do grupo controle, acima descrito (item 6.3.a.3, referente ao primeiro experimento da Etapa III).

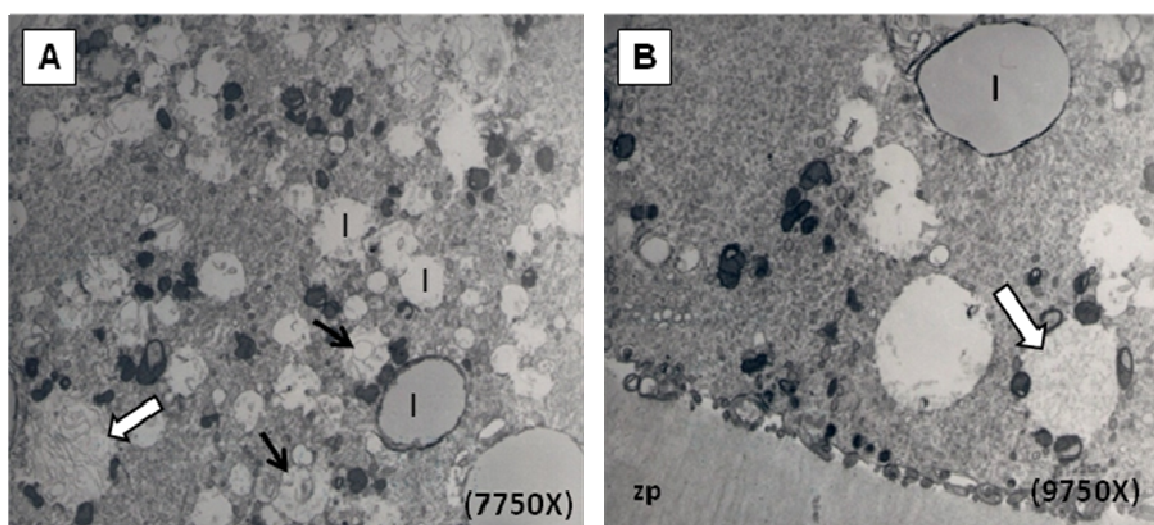


Figura 11- Características ultraestruturais de COCs ovinos após 24 horas de cultivo *in vitro* na presença de 100 μM de roscovitina, seguido por 22 horas na ausência de fármacos inibidores da meiose: (A) aspecto geral do citoplasma, mitocôndrias dispersas, muitos grânulos de lipídeo (I), figuras mielínicas (seta negra), áreas de vazio citoplasmático (seta branca) (7750X); (B) poucos grânulos corticais isolados e alinhados, grânulos de lipídeo (I), áreas de vazio citoplasmático (seta branca) (9750X).

6.3.b-Ciclohexemida (Etapa III - segundo experimento):

Avaliação da reversibilidade do bloqueio meiótico oocitário promovido pela ciclohexemida, caracterizada pelo reinício e continuidade das divisões meióticas concomitante com a progressão da maturação citoplasmática.

6.3.b.1- Avaliação da expansão do *cumulus*

De acordo com a tabela 8, significativa porcentagem dos COCs avaliados quanto à expansão das células do *cumulus*, após 46 horas de cultivo *in vitro*, sendo 24 horas em meio de maturação padrão (item 5.2) suplementado com 1µg/mL de ciclohexemida e 22 horas na ausência deste fármaco, estava com expansão total do *cumulus* (84,23%), sendo que apenas 11,61% apresentaram expansão parcial e 4,17% ausência de expansão. Já no grupo controle, do mesmo modo como verificado no item 6.3.a.1, a maioria dos COCs apresentou expansão total do *cumulus* (91,96%), enquanto apenas 4,20% apresentaram expansão parcial e 3,85% ausência de expansão.

TABELA 8. Expansão das células do *cumulus* de COCs de ovinos após o cultivo *in vitro* por 24 horas na presença de 1µg/mL de ciclohexemida seguido por mais 22 horas na ausência deste fármaco. Grupo Controle: cultivo *in vitro* por 46 horas em meio de maturação livre de fármacos inibidores da meiose.

GRUPO	COCs avaliados (n)	COCs (%) com Expansão		
		Total	Parcial	Ausente
Controle	286	91,96	4,20	3,85
Ciclohexemida	336	84,23	11,61	4,17

6.3.b.2- Avaliação da maturação nuclear

O cultivo *in vitro* dos COCs de ovinos por 46 horas, sendo 24 horas na presença de 1µg/mL de ciclohexemida seguido por 22 horas na ausência deste fármaco, permitiu a reversibilidade do retardo meiótico promovido pela ciclohexemida e a progressão da maturação nuclear em 60,95% dos oócitos analisados, enquanto apenas 2,86%; 11,43% e 20% permaneceram em VG, QVG e MI, respectivamente. Já no grupo controle, assim como constatado no item 6.3.a.2, significativa porcentagem dos oócitos analisados (77,36%) estava

em MII, enquanto apenas 1,89%; 8,49% e 7,55% permaneceram nos estádios de VG, QVG e MI, respectivamente. Em ambos os grupos (controle e tratamento) a taxa de oócitos degenerados e não identificados se manteve baixa e dentro do esperado (4,7%) (Tab.9).

TABELA 9. Estádios de maturação nuclear (MN) de oócitos de ovinos cultivados por 24 horas na presença de 1µg/mL de ciclohexemida seguido por mais 22 horas na ausência deste fármaco. Grupo Controle: cultivo *in vitro* por 46 horas em meio de maturação livre de fármacos inibidores da meiose.

GRUPO	COCs avaliados (n)	COCs (%) em cada estágio de MN				
		VG	QVG	MI	MIl	Deg./N.I.
Controle	106	1,89	8,49	7,55	77,36	4,72
Ciclohexemida	105	2,86	11,43	20,0	60,95	4,76

VG = vesícula germinativa; QVG = quebra de vesícula germinativa; MI = metáfase I; MIl = metáfase II, DEG/ Não iden. = degenerado ou não identificado

6.3.b.3- Avaliação da maturação citoplasmática

- COCs do grupo controle

A análise ultraestrutural dos COCs após 46 horas de cultivo *in vitro* em meio de maturação padrão (item 5.2) na ausência de inibidores da meiose revelou os mesmo sinais de maturidade e de envelhecimento celular observados nos COCs do grupo controle do item 6.3.a.3, correspondente ao primeiro experimento da Etapa III.

-COCs tratados com ciclohexemida

A análise ultraestrutural dos COCs após 46 horas de cultivo *in vitro*, sendo 24 horas na presença de 1µg/mL de ciclohexemida e 22 horas na ausência deste inibidor da meiose revelou características de maturidade semelhantes às observadas nos COCs do grupo controle, que foram submetidos a 24 horas de cultivo *in vitro* na ausência de fármacos (item 6.2.a.3, correspondente ao primeiro experimento da Etapa II).

No entanto, a expansão total das células do *cumulus* não foi acompanhada por perda substancial de células e, apesar da ausência de complexos juncionais, os prolongamentos das células do *cumulus* através da

zona pelúcida estavam presentes (Fig.12-A). Além disso, não foram detectados sinais de envelhecimento celular nem no oócito e nem nas células do *cumulus*.

Vale ressaltar ainda que apesar dos inúmeros indícios de maturidade, também foi verificada grande quantidade de grânulos de lipídeos (Fig.12-B,C), uniformemente distribuídos por todo ooplasma, que consiste numa importante característica de imaturidade.

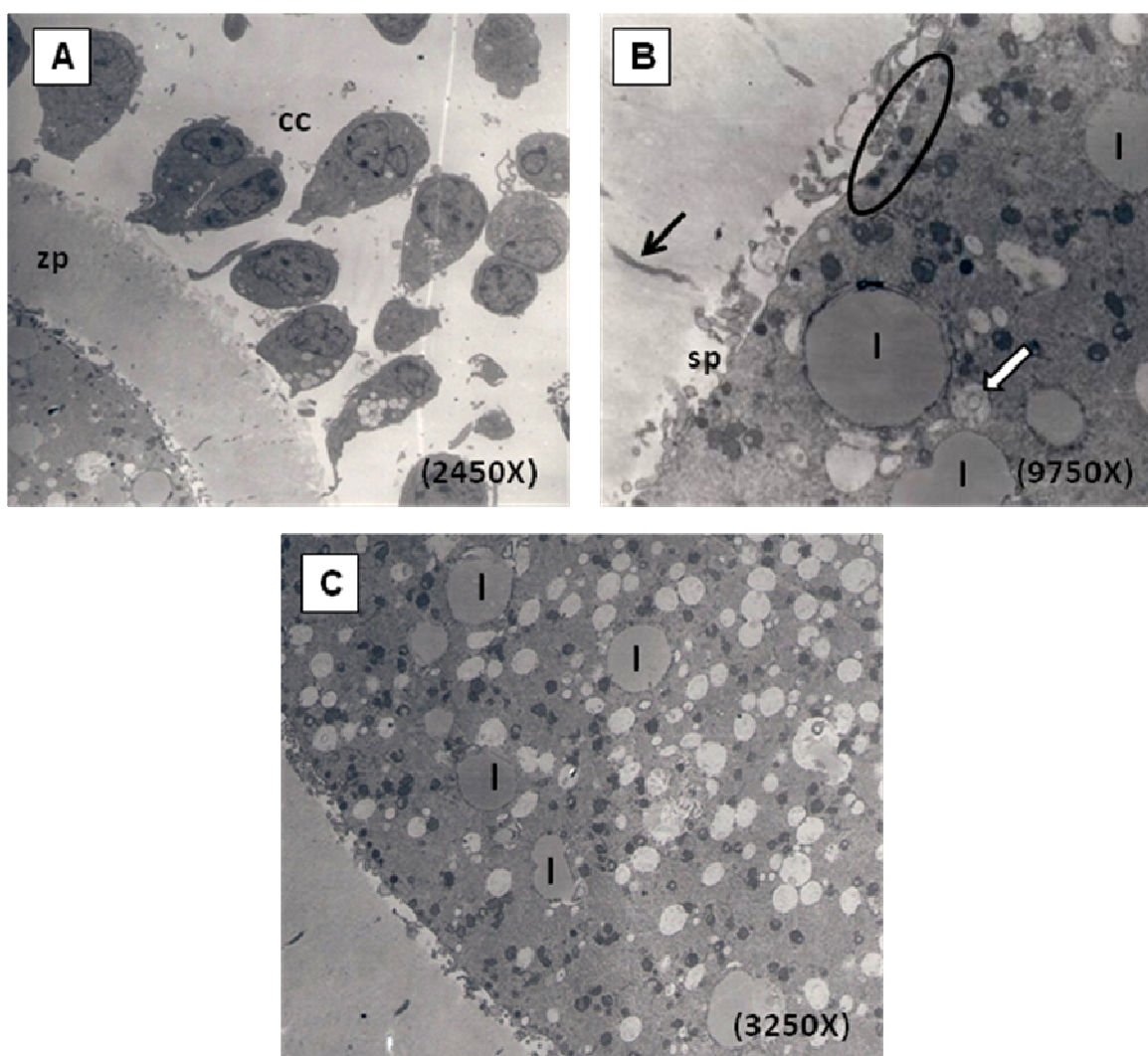


Figura 12- Características ultraestruturais de COCs ovinos após 24 horas de cultivo *in vitro* na presença de 1µg/mL de ciclohexemida, seguido por 22 horas na ausência de fármacos inibidores da meiose: **(A)** expansão total das células do *cumulus* (cc), sem perda de células (2450X); **(B)** prolongamentos das células do cumulus (seta negra), ausência complexo juncionais, espaço perivitelínico (sp) bem desenvolvido, grande quantidade de microvilosidades, grânulos de lipídeo (seta branca), figuras mielínicas (seta branca), grânulos corticais isolados e alinhados à membrana do oócito (círculo negro) (9750X); **(C)** aspecto geral do ooplasma, muitas mitocôndrias dispersas, muitos grânulos de lipídeos (3250X).

6.4-Comparação dos resultados obtidos nas Etapas I, II e III

Para melhor compreensão, os resultados submetidos à análise estatística foram apresentados em forma de gráficos e tabelas.

6.4.a-Comparação da expansão das células do *cumulus*

A análise da distribuição dos COCs de acordo com o grau de expansão das células do *cumulus* (Fig. 13 e 14) revelou que houve tendência à expansão total do *cumulus* após 24 e 46 horas de cultivo *in vitro* na ausência de fármacos inibidores da meiose (Grupos Controle), sendo que a proporção de COCs com expansão total do *cumulus* foi maior ao final das 46 horas de cultivo *in vitro*. Já os COCs tratados por 24 horas com 100 μ M de roscovitina tenderam à ausência de expansão do *cumulus*, sendo que esta tendência se manteve após o cultivo *in vitro* por mais 22 horas em meio de maturação padrão livre de fármacos inibidores da meiose. Em contrapartida, no tratamento por 24 horas com 1 μ g/mL de ciclohexemida, houve tendência à expansão parcial do *cumulus*, sendo que significativa proporção dos COCs tendeu à expansão total do *cumulus* após o cultivo *in vitro* por mais 22 horas na ausência de fármacos inibidores da meiose.

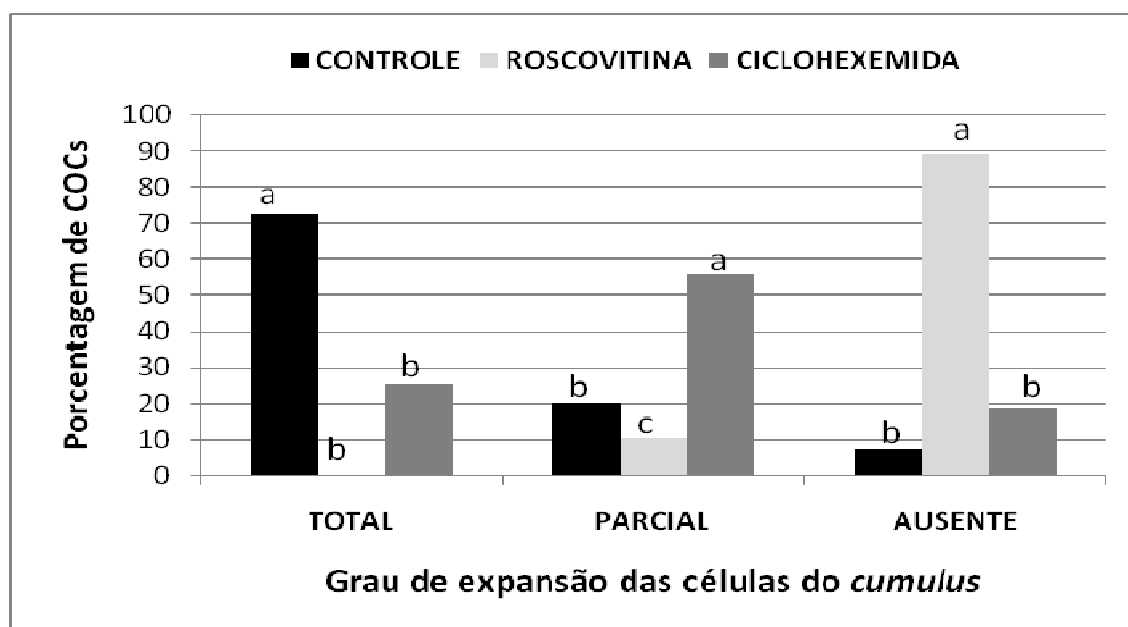


Figura 13 - Porcentagem de COCs de acordo com o grau de expansão das células do *cumulus*, após 24 horas de cultivo *in vitro* em meio de maturação padrão (Controle) suplementado com 100 μ M de roscovitina ou 1 μ g/mL de ciclohexemida. (Valores com letras diferentes, dentro do mesmo grau de expansão das células do *cumulus*, são significativamente diferentes).

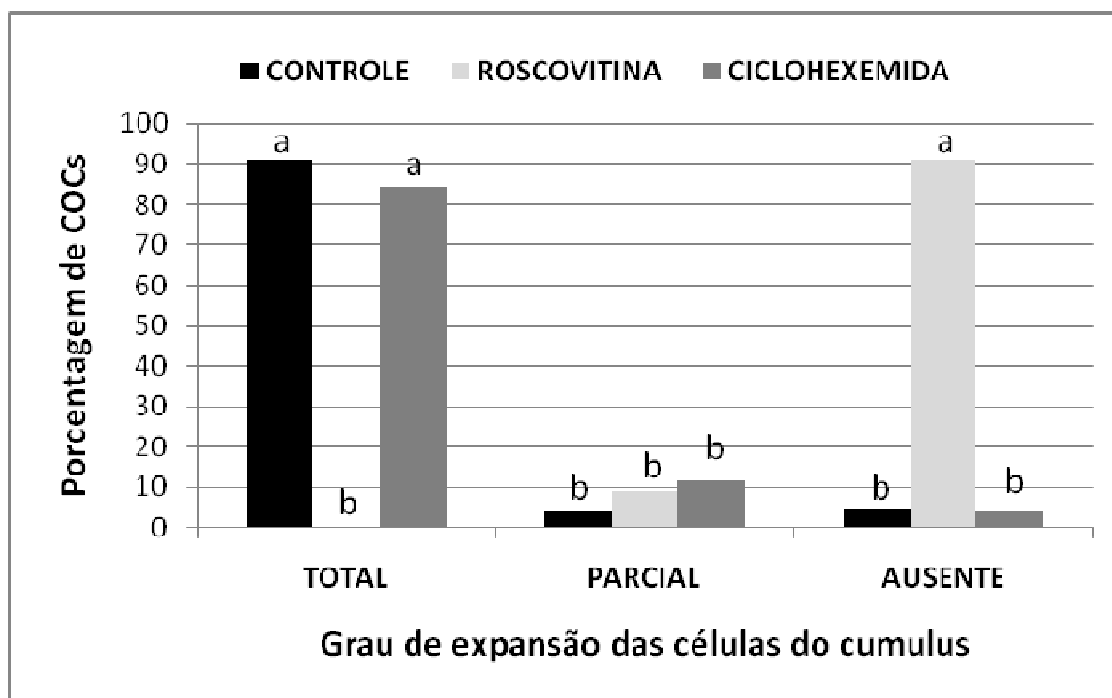


Figura 14 - Porcentagem de COCs de acordo com o grau de expansão das células do *cumulus*, após o cultivo *in vitro* por 24 horas na presença de 100 μ M de roscovitina ou 1 μ g/mL de ciclohexemida, seguido por mais 22 horas na ausência destes fármacos. Controle: cultivo *in vitro* por 46 horas em meio de maturação padrão livre de inibidores da meiose. (Valores com letras diferentes, dentro do mesmo grau de expansão das células do *cumulus* são significativamente diferentes).

Todos os COCs selecionados para este experimento apresentavam pelo menos uma camada de células do *cumulus* compacta, ou seja, 100% de ausência de expansão e, conforme esperado, após o período de 24 horas de cultivo *in vitro* na ausência de fármacos inibidores da meiose (Grupo Controle), significativa proporção de COCs (72,6%) apresentou expansão total das células do *cumulus*, que está diretamente relacionada com a progressão da maturação oocitária (Tab. 10). Nota-se ainda que, ao final de 46 horas de cultivo *in vitro*, maior porcentagem de COCs do grupo controle apresentou expansão total do *cumulus* (91,18%), sendo que estas células estavam mais dispersas, o que provavelmente pode ser decorrente da exposição prolongada às condições de cultivo *in vitro* (Tab. 11).

Em contrapartida, não houve expansão das células do *cumulus* em 89,5% dos COCs cultivados *in vitro*, por 24 horas, na presença de 100 μ M roscovitina (Tab. 10), sendo que esta ausência de expansão também foi detectada em 90,97% dos COCs que foram cultivados *in vitro* por mais 22

horas na ausência deste fármaco (Tab.11). Já no tratamento por 24 horas com 1µg/mL de ciclohexemida, porcentagem considerável dos COCs (55,58%) apresentou expansão parcial do *cumulus* (Tab.10), sendo que o cultivo *in vitro* por mais 22 horas em meio de maturação padrão livre inibidores da meiose, permitiu a expansão total das células do *cumulus* em 84,23% dos COCs analisados.

TABELA 10 – Expansão das células do cumulus dos COCs de ovinos após 24 horas de cultivo *in vitro* em meio de maturação padrão (Controle) suplementado com 100 uM de roscovitina (ROSCO) ou de 1µg/mL ciclohexemida (CICLO).

GRUPO	Expansão do cumulus		
	TOTAL (%)	PARCIAL (%)	AUSENTE (%)
Controle	18,65 (72,60) ^a	5,19 (20,21) ^b	1,85 (7,19) ^b
ROSCO	0,00 (0,00) ^b	3,65 (10,50) ^c	31,00 (89,50) ^a
CICLO	7,67 (25,67) ^b	16,60 (55,58) ^a	5,60 (18,75) ^b
Parâmetros Estatísticos			
s	1,25	1,17	0,92
CV (%)	53,10	42,24	30,17
F	35,51	13,86	76,21
F crítico	3,19	3,19	3,19
DMS	1,40	1,31	1,03

Médias reais dos dados transformados em Raiz ($x+0,5$), comparadas pelo teste de Scheffé a 5% de probabilidade. Valores com letras diferentes, dentro da mesma coluna são significativamente diferentes.

TABELA 11. Expansão das células do *cumulus* de COCs de ovinos após o cultivo *in vitro* por 24 horas na presença de 100 μ M de roscovitina ou 1 μ g/mL de ciclohexemida, seguido por mais 22 horas na ausência destes fármacos. Grupo Controle: cultivo *in vitro* por 46 horas em meio de maturação padrão isento de inibidores da meiose.

GRUPO	Expansão do cumulus		
	TOTAL (%)	PARCIAL (%)	AUSENTE (%)
Controle	29,18 (91,18) ^a	1,35 (4,23) ^b	1,47 (4,60) ^b
ROSCO	0,00 (0,00) ^b	3,38 (9,03) ^b	34,00 (90,97) ^a
CICLO	31,44 (84,23) ^a	4,33 (11,61) ^b	1,56 (4,17) ^b
Parâmetros Estatísticos			
s	1,00	1,11	0,98
CV (%)	25,96	76,46	36,23
F	67,60	0,66	62,12
F crítico	3,30	3,30	3,30
DMS	1,40	1,56	1,37

Médias reais dos dados transformados em Raiz ($x+0,5$), comparadas pelo teste de Scheffé a 5% de probabilidade. Valores com letras diferentes, dentro da mesma coluna são significativamente diferentes.

6.4.b – Comparação da maturação nuclear

6.4.b.1- Eficiência da inibição meiótica (Etapa II)

A análise da distribuição dos COCs nos diferentes estádios de maturação nuclear após cultivo *in vitro* por 24 horas em meio de maturação padrão (Grupo Controle) suplementado com 100 μ M de roscovitina (primeiro experimento da Etapa II) ou com 1 μ g/mL de ciclohexemida (segundo experimento da Etapa II), de acordo com a figura 15, revelou que os COCs dos Grupos Controle de ambos os experimentos tenderam ao estádio de metáfase II, sendo que taxas relativamente baixas de COCs foram detectadas nos demais estádios. Já na presença da roscovitina, quantidade considerável de COCs permaneceu nos estádios de QVG e MI, enquanto que na presença da ciclohexemida, maior taxa de COCs tendeu ao estádio de MI e nenhum COC atingiu o estádio de MII. Vale ressaltar ainda que taxa relativamente alta de COCs degenerados ou não identificados foi verificada no grupo tratado com roscovitina.

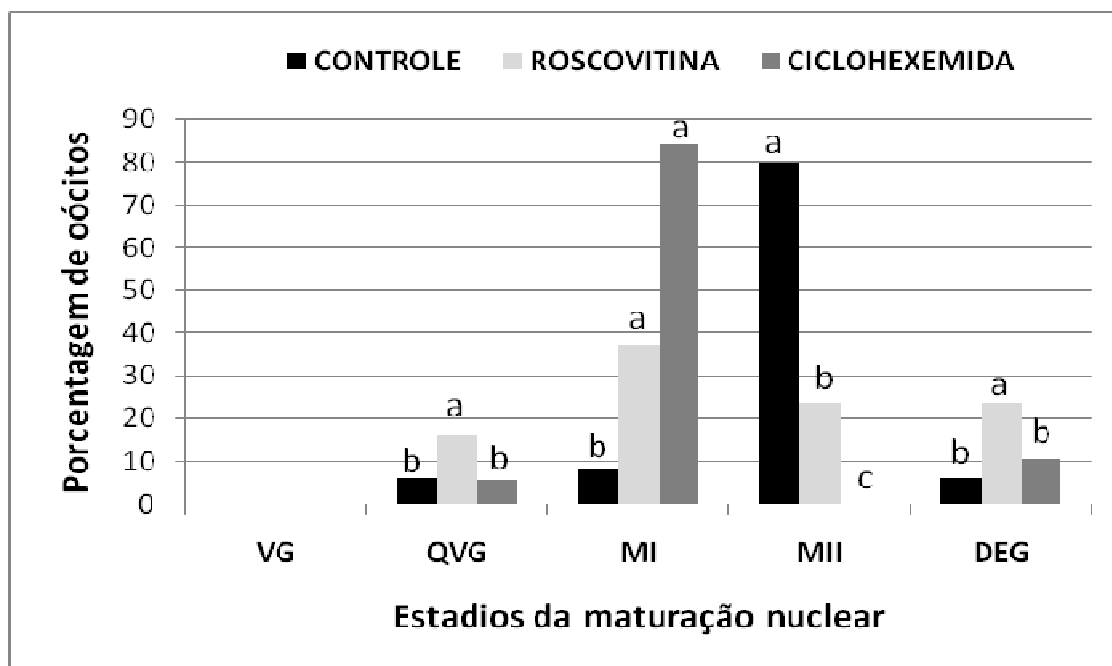


Figura 15 - Porcentagem de COCs nos diferentes estádios de maturação nuclear após 24 horas de cultivo *in vitro* em meio de maturação padrão (Controle) suplementado com 100 μ M de roscovitina ou 1 μ g/mL de ciclohexemida. VG = vesícula germinativa; QVG = quebra de vesícula germinativa; MI = metáfase I; MII = metáfase II, DEG = degenerado ou não identificado. (Valores com letras diferentes, dentro do mesmo estágio da maturação nuclear, são significativamente diferentes).

A análise estatística dos resultados pelo teste de Scheffé (Tab.12) revelou ainda que, ao final de 24 horas de cultivo *in vitro* na presença de 100 μ M de roscovitina, maior quantidade dos COCs (15,84%) se manteve em QVG, diferindo significativamente dos demais grupos. Apesar do cultivo *in vitro* na presença de 1 μ g/mL de ciclohexemida resultar em maior proporção de COCs em MI (84,11%), este resultado não foi significativamente diferente do observado no grupo tratado com roscovitina (37,23%), no entanto, foi significativamente superior ao constatado no grupo controle (8,13%). Com relação aos COCs que alcançaram o estágio de metáfase II, houve diferença significativa entre os 3 grupos experimentais, com maior proporção no grupo controle (79,90%), enquanto que no grupo tratado com ciclohexemida não houve progressão da maturação nuclear em nenhum COC. Já a quantidade de COCs classificados como degenerados ou não identificados foi significativamente superior no grupo tratado com roscovitina (23,47%), diferindo dos demais grupos experimentais.

TABELA 12- Estádios de maturação nuclear (MN) após 24 horas de cultivo *in vitro* na ausência (Grupo Controle) ou presença de roscovitina (100 µM) ou de ciclohexemida (1 µg/mL).

GRUPO	Média* de COCs (%) em cada estágio da MN				
	VG	QVG (%)	MI (%)	M II (%)	Deg./ N.I. (%)
Controle	0	1,00 (5,98) ^b	1,36 (8,13) ^b	13,36 (79,90) ^a	1,00 (5,98) ^b
ROSCO	0	3,28 (15,84) ^a	7,71 (37,23) ^a	4,86 (23,47) ^b	4,86 (23,47) ^a
CICLO	0	1,00 (5,56) ^b	15,14 (84,11) ^a	0,00 ^c	1,86 (10,33) ^b
Parâmetros Estatísticos					
s		0,42	0,90	0,64	0,49
CV		29,48	34,74	28,97	30,34
F		9,23	18,68	49,93	11,41
F crítico		3,38	3,38	3,38	3,38
DMS		0,65	1,40	0,99	0,76

*Médias reais dos dados transformados em Raiz ($x+0,5$), comparadas pelo teste de Scheffé a 5% de probabilidade. Valores com letras diferentes, dentro da mesma coluna são significativamente diferentes. VG = vesícula germinativa; QVG = quebra da vesícula germinativa; MI = metáfase I, MII = metáfase II; Deg./N.I. = degenerado ou não identificado

6.4.b.2 – Reversibilidade da inibição meiótica (Etapa III)

A análise da distribuição dos COCs nos diferentes estádios de maturação nuclear após 46 horas de cultivo *in vitro* (Fig. 16), revelou que os COCs do Grupo Controle, que foram cultivados na ausência de fármacos inibidores da meiose, tenderam a se manter no estágio de metáfase II, sendo que taxas relativamente baixas de COCs foram detectadas nos demais estádios. Esta tendência ao estágio de metáfase II também foi constatada, porém com menor intensidade, nos COCs tratados por 24 horas com 100 µM de roscovitina ou com 1 µg/mL de ciclohexemida, seguido pelo cultivo *in vitro* por 22 horas em meio de maturação livre de inibidores da meiose. Nota-se ainda quantidade considerável de COCs degenerados ou não identificados no grupo tratado com roscovitina, enquanto que no grupo tratado com ciclohexemida evidencia-se maior proporção de COCs em metáfase I quando comparado aos demais grupos.

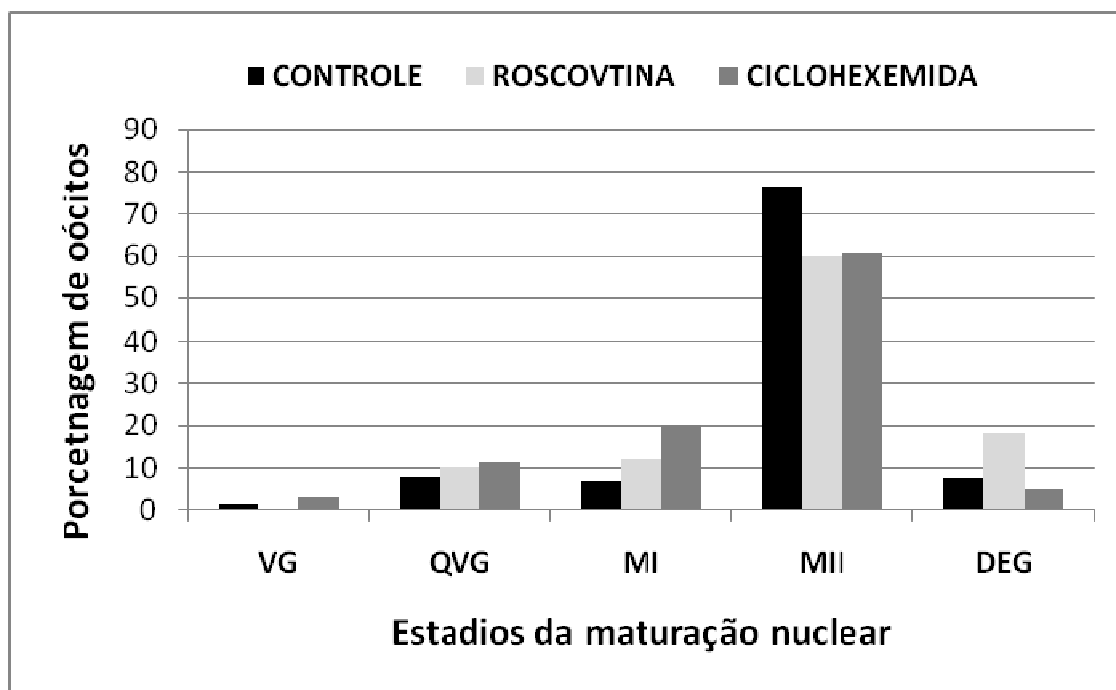


Figura 16 - Porcentagem de COCs diferentes estádios de maturação nuclear, após o cultivo *in vitro* por 24 horas na presença de 100 μ M de roscovitina ou 1 μ g/mL de ciclohexemida, seguido por mais 22 horas na ausência destes fármacos. Controle: cultivo *in vitro* por 46 horas em meio de maturação padrão isento de inibidores da meiose. VG = vesícula germinativa; QVG = quebra de vesícula germinativa; MI = metáfase I; MII = metáfase II, DEG = degenerado ou não identificado. * $p > 0,05$ = não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

A análise estatística dos resultados pelo teste de Scheffé (Tab.13) revelou que a inibição meiótica promovida pela roscovitina e pela ciclohexemida foi reversível, sendo que quantidade significativa de COCs (60% e 60,95%, respectivamente) alcançou o estágio de metáfase II ao final das 46 horas de cultivo *in vitro*. Apesar da maior proporção de COCs em MII no grupo controle (76,39%), não houve diferença significativa com relação aos demais grupos experimentais. Também foi verificada maior quantidade de COCs degenerados ou não identificados no grupo tratado com roscovitina (18%) que, no entanto, não diferiu significativamente dos demais grupos. Não foi observada diferença digna de nota entre os 3 grupos experimentais, com relação à quantidade de COCs nos estádios de vesícula germinativa, quebra de vesícula germinativa e metáfase I.

TABELA 13. Estádios da maturação nuclear (MN) de oócitos de ovinos após o cultivo *in vitro* por 24 horas na presença de 100 μ M de roscovitina ou 1 μ g/mL de ciclohexemida, seguido por mais 22 horas na ausência destes fármacos. Grupo Controle: cultivo *in vitro* por 46 horas em meio de maturação padrão isento de inibidores da meiose.

GRUPO	Média de COCs (%) em cada estágio da MN				
	VG (%)	QVG (%)	MI (%)	M II (%)	Deg./ N.I. (%)
Controle	0,44 (1,56)	2,22 (7,47)	1,89 (6,70)	21,55 (76,39)	2,11 (7,48)
ROSCO	0,00	3,00 (10,00)	3,60 (12,00)	18,00 (60,00)	5,40 (18,00)
CICLO	0,75 (2,86)	3,00 (11,43)	5,25 (20,00)	16,00 (60,95)	1,25 (4,76)
Parâmetros Estatísticos					
s	0,38	0,72	0,67	1,00	0,66
CV	44,12	43,58	35,61	23,45	38,27
F	0,70	0,06	1,99	0,64	3,43
F crítico	3,68	3,68	3,68	3,68	3,80
DMS	0,78	1,47	1,36	2,03	1,33

*Médias reais dos dados transformados em Raiz ($x+0,5$), comparadas pelo teste de Scheffé a 5% de probabilidade. $p>0,05$. VG = vesícula germinativa; QVG = quebra da vesícula germinativa; MI = metáfase I, MII = metáfase II; Deg./N.I. = degenerado ou não identificado

6.4.c - Comparação da maturação citoplasmática

Conforme exposto nas tabelas 14 e 15, houve adequada progressão da maturação citoplasmática nos COCs do Grupo Controle, cultivados *in vitro* tanto por 24 horas como por 46 horas, os quais apresentaram sinais característicos de maturidade. No entanto, ao final de 46 horas de cultivo também foram verificados sinais de degeneração, indicativos de envelhecimento celular, tanto nas células do *cumulus* como no ooplasma, decorrente da exposição prolongada às condições *in vitro*.

Do mesmo modo como no Grupo Controle, os COCs tratados com 1µg/mL de ciclohexemida também apresentaram sinais de maturidade ao final de 24 e 46 horas de cultivo *in vitro*, sem quaisquer características de degeneração no *cumulus* ou no ooplasma, mesmo após cultivo prolongado (Tab 14 e 15). No entanto, também foi detectada grande quantidade de grânulos de lipídeo uniformemente distribuídos por todo ooplasma, que consiste numa importante característica de imaturidade. Já nos COCs tratados por 24 horas com 100 µM de roscovitina, foi verificado retardo da progressão da maturação citoplasmática, caracterizado pela presença de sinais de imaturidade e maturidade celular, além de degeneração das células do *cumulus* (Tab.14). Estas mesmas características além dos sinais de degeneração do ooplasma foram detectadas ao final das 22 horas adicionais de cultivo *in vitro* na ausência deste fármaco inibidor da meiose (Tab.15).

TABELA 14 - Características ultraestruturais dos COCs de ovinos antes (condições prévias) e após o cultivo *in vitro* por 24 horas na ausência (Controle) e na presença de roscovitina (100 μ M) ou de ciclohexemida (1 μ g/mL).

Estruturas e organelas avaliadas	Condição prévia dos COCs	Controle	Roscovitina	Ciclohexemida
Expansão do cumulus	ausente	total	parcial	total
Prolongamentos do cumulus	presença	ausência	ausência	ausência
Complexos juncionais	presença	ausência	redução da quantidade	ausência
Espaço perivitelínico	pequeno	desenvolvido	desenvolvido	desenvolvido
Microvilosidades do oócito	poucas e pequenas	muitas	poucas	muitas
Mitocôndrias	aglomeradas na periferia	muitas e dispersas	muitas e dispersas	muitas e dispersas
Retículos endoplasmático (associados às mitocôndrias e dispersos no ooplasma)	desenvolvidos e em grande quantidade	grande quantidade	grande quantidade e dilatados	grande quantidade
Grânulos de lipídeo	muitos e dispersos	poucos e dispersos	muitos e dispersos	poucos e dispersos
Complexos de Golgi	vários, desenvolvidos, na periferia do oócito	poucos e pequenos	ausente	poucos e pequenos
Grânulos Corticais	poucos, em grumos e dispersos	vários, isolados e alinhados à membrana do oócito	poucos, isolados e alinhados à membrana do oócito	vários, isolados e alinhados à membrana do oócito
Vesículas eletrônicas	poucas	muitas e dispersas	Poucas e dispersas	muitas e dispersas
Figuras mielínicas	algumas	muitas e dispersas	muitas e dispersas	muitas e dispersas
Vesículas cobertas	poucas e pequenas	ausência	ausência	ausência
Degeneração no cumulus	ausência	ausência	presença	ausência
Degeneração no ooplasma	ausência	ausência	ausência	ausência

TABELA 15 - Características ultraestruturais dos COCs de ovinos após o cultivo *in vitro* por 24 horas na presença de 100 μ M de roscovitina ou 1 μ g/mL de ciclohexemida, seguido por mais 22 horas na ausência destes fármacos. Controle: cultivo *in vitro* por 46 horas em meio de maturação padrão livre de inibidores da meiose.

Estruturas e organelas avaliadas	Controle	Roscovitina	Ciclohexemida
Expansão do cumulus	Expansão total, dispersão e perda de células	Expansão total, dispersão e perda de células	Expansão total, sem perda de células
Prolongamentos do cumulus	ausência	ausência	presença
Complexos juncionais	ausência	redução da quantidade	ausência
Espaço perivitelinico	desenvolvido	desenvolvido	desenvolvido
Microvilosidades do oócito	muitas	poucas	muitas
Mitocôndrias	muitas e dispersas	muitas e dispersas	muitas e dispersas
Retículos endoplasmático (associados às mitocôndrias e dispersos no ooplasma)	grande quantidade	grande quantidade e dilatados	grande quantidade
Grânulos de lipídeo	poucos e dispersos	muitos e dispersos	Muitos e dispersos
Complexos de Golgi	poucos e pequenos	ausente	poucos e pequenos
Grânulos Corticais	vários, isolados e alinhados à membrana do oócito	poucos, isolados e alinhados à membrana do oócito	vários, isolados e alinhados à membrana do oócito
Vesículas eletrônicas	muitas e dispersas	Poucas e dispersas	muitas e dispersas
Figuras mielínicas	poucas	muitas e dispersas	muitas e dispersas
Vesículas cobertas	ausência	várias	ausência
Degeneração no cumulus	presença	presença	ausência
Degeneração no ooplasma	presença	presença	ausência

7 - DISCUSSÃO

7.1-Expansão das células do *cumulus*

As células do *cumulus* correspondem a um grupo de células da granulosa que circundam o oócito e com o qual estabelecem íntima comunicação através dos complexos juncionais. A presença destas células e sua interação com o oócito através dos complexos juncionais é extremamente importante para manutenção do oócito no estadió de prófase I, uma vez que permite a passagem de fatores inibidores da meiose, entre os quais o cAMP; para a progressão do processo de maturação citoplasmática devido a transferência de íons, aminoácidos e demais substâncias de baixo peso molecular e também para o reinício das divisões meióticas, por conduzir o estímulo gonadotrófico aos oócitos já que estes não apresentam receptores para LH (TANGHE et al., 2002). Além disso, as células do *cumulus* também exercem importante função na condução do oócito dentro do oviduto, após a ovulação, e participam dos complexos mecanismos envolvidos no processo de fertilização (SOOM et al., 2002).

Esta íntima associação entre as células do *cumulus* e o oócito se forma e se mantém durante o crescimento folicular e desenvolvimento oocitário. Nos oócitos imaturos, ou seja, que ainda não completaram os processos de maturação nuclear e citoplasmática, a manutenção da integridade das células do *cumulus* e dos complexos juncionais é indispensável para o progresso do desenvolvimento oocitário e aquisição de competência para finalizar a maturação e sustentar os posteriores processos de fertilização e desenvolvimento embrionário (HYTTEL et al., 1989; SHIMADA & TERADA, 2002).

In vivo, a dissociação entre as células do *cumulus* e o oócito, se inicia durante o período pré-ovulatório em resposta ao estímulo gonadotrófico e progride ao longo da maturação oocitária (GILULA et al., 1978). Já *in vitro*, este processo é desencadeado pela simples remoção mecânica dos COCs do ambiente folicular e pelo cultivo em condições adequadas. A disjunção dos complexos juncionais está diretamente relacionada ao reinício meiótico oocitário e é decorrente da expansão do *cumulus* (MOTLÍK et al., 1986),

caracterizada pela síntese e secreção de ácido hialurônico por estas células, o qual se deposita entre os espaços intercelulares (BALL et al., 1982).

Portanto, conforme preconizado para o processo de produção *in vitro* de embriões, apenas COCs que apresentavam pelo menos uma camada de células do *cumulus* compactas foram selecionados para esta pesquisa, uma vez que a presença destas células é extremamente importante para o processo de maturação oocitária (BLONDIN & SIRARD, 1995). De acordo com o descrito anteriormente, a expansão do *cumulus* pode ser considerada um indicativo de que os oócitos já reiniciaram o processo de maturação nuclear e, portanto, COCs com *cumulus* expandidos foram descartados. Já os oócitos desnudos, não apresentam o suporte das células do *cumulus* para adequada progressão da maturação oocitária e devido a isto também foram descartados.

Conforme esperado, a análise visual, sob estereomicroscópio, das células do *cumulus* revelou que as condições de cultivo *in vitro* foram adequadas e permitiram a expansão total do *cumulus* em 72,60% e 91,18% dos COCs após 24 e 46 horas, respectivamente, de maturação *in vitro* na ausência de inibidores da meiose (Grupos Controle), assim como houve adequada progressão da maturação nuclear, com 79,90% e 76,39% dos COCs em MII (Grupos Controle), após os mesmos períodos de cultivo *in vitro*. Estes resultados corroboram as evidências de Isobe et al. (1998), que infeririam que o reinício meiótico em COCs de suínos está diretamente relacionado à perda de comunicação entre as células do *cumulus* e destas com o oócito, decorrente da expansão do *cumulus*.

Já o cultivo *in vitro* por 24 horas na presença de 100µM de roscovitina inibiu a expansão das células do *cumulus* em 89,5% dos COCs analisados, do mesmo como constatado por Romar et al. (2006) e Schoevers et al. (2005), após a exposição dos COCs de suínos por 48 e 22 horas, respectivamente, à 50 µM de roscovitina. Esta ausência de expansão das células do *cumulus* também foi verificada nos COCs de bovinos tratados por 24 horas com 25µM de roscovitina (VIGNERON et al., 2003) ou com 12,5µM de roscovitina associada a 6,25µM de butirolactona I (PONDERATO et al., 2001).

Schoevers et al. (2005) supõem ainda que a inibição da expansão do *cumulus*, decorrente do tratamento com roscovitina, permite a interação entre as células do *cumulus* e o oócito por período mais longo. Contudo, a troca

bidirecional de substâncias de baixo peso molecular, entre elas de fatores inibidores da meiose, depende da manutenção da integridade das células do *cumulus* e dos complexos juncionais (ISOBE et al., 1998). No presente estudo, no entanto, a análise em microscópio eletrônico de transmissão dos COCs de ovinos tratados com roscovitina revelou que apesar da presença de poucos complexos juncionais, as células do *cumulus* também apresentavam sinais de degeneração com provável redução da função celular.

Os resultados deste estudo demonstram ainda que 90,97% dos COCs tratados com roscovitina não apresentaram expansão do *cumulus* mesmo após o cultivo *in vitro* por mais 22 horas em meio de maturação padrão livre de fármacos inibidores da meiose, assim como constatado por Romar et al. (2006). Do mesmo modo, Lonergan et al. (2003), relataram que o tratamento dos COCs de bovinos com 125 μ M de roscovitina, por 24 horas, resultou em perda prematura, degeneração e ausência de expansão das células do *cumulus*, que se manteve mesmo após o cultivo *in vitro* por mais 24 horas na ausência deste fármaco.

Ao se considerar ainda que as MAPKs, além do cAMP, estão envolvidas no mecanismo molecular de síntese e secreção de ácido hialurônico (MOTLIK et al., 2000), que está diretamente relacionado à síntese de ácido hialurônico (CHEN et al., 1990), e que a roscovitina bloqueia a ativação do MPF e da via das MAPKs (MERMILLOD et al., 2000), supõe-se que este inibidor da meiose atua através da células do *cumulus*.

No entanto, Vigneron et al. (2003) inferiram que a roscovitina não interfere na funcionalidade das células do *cumulus*. Esta discrepância de resultados entre autores provavelmente está relacionada à concentração do fármaco em estudo. Han et al. (2006), sugeriram ainda que a roscovitina não necessita da intermediação das células do *cumulus* para promover a inibição oocitária, e que estas células protegem o oócito dos efeitos tóxicos deste fármaco.

Já o tratamento por 24 horas com 1 μ g/mL de ciclohexemida resultou em maior proporção de COCs com expansão parcial do *cumulus* (55,58%), sendo que o cultivo *in vitro* por mais 22 horas ausência deste inibidor da meiose, permitiu a expansão total do *cumulus* em 84,23% dos COCs. A análise ultraestrutural dos COCs de ovinos revelou ainda que o tratamento com

ciclohexemida assim como o cultivo *in vitro* prolongado não resultou em degeneração das células do *cumulus*, no entanto, houve retração dos prolongamentos citoplasmáticos e da disjunção dos complexos juncionais.

Diferentemente, Sirard et al.(1989) e Saeki et al.(1997) observaram que o cultivo *in vitro* dos COCs de bovinos por 24 e 48 horas, respectivamente, na presença de 10µg/mL de ciclohexemida inibiu a expansão do *cumulus*, sendo que Saeki et al. (1997) relataram ainda degeneração e desagregação das células do *cumulus* e atribuíram tais alterações ao tempo prolongado de cultivo *in vitro*. Esta divergência de resultados entre autores provavelmente está relacionada à concentração do fármaco e à espécie animal em estudo. Ainda segundo Ponderato et al. (2001), quando os fármacos inibidores da meiose são utilizados em concentrações e por período de tempo adequados, há a expansão total das células do *cumulus* após o cultivo *in vitro* na ausência destes inibidores.

Desta forma, a análise dos resultados obtidos neste estudo revela que a roscovitina interferiu de maneira irreversível nas células do *cumulus*, enquanto que a ação da ciclohexemida foi menos intensa e completamente reversível. No entanto, ainda não está totalmente esclarecido se a inibição meiótica promovida por estes fármacos é decorrente da ação direta sobre os oócitos ou indireta, através das células do *cumulus* (YE et al. 2005). Vale ressaltar ainda que as informações disponíveis na literatura com relação aos efeitos desses fármacos inibidores sobre as células do *cumulus* são escassas e não há estudos similares com COCs de ovinos, o que dificulta o aprofundamento da discussão.

7.2-Maturação nuclear

7.2.a – Condição prévia dos COCs: Avaliação do estadió de maturação nuclear dos oócitos de ovinos antes de serem submetidos à maturação *in vitro*.

A elevada porcentagem de oócitos no estadió de quebra de vesícula germinativa (83,11%), antes de serem submetidos à maturação *in vitro*, constatada no presente estudo concorda com Jimenez-Macedo et al. (2006) que, em seus estudos com COCs de cabras pré-púberes, observaram que dos

153 oócitos analisados quanto a maturação nuclear, logo após a coleta, 7,2% estavam em VG; 73,8% estavam em QVG; 12,4% estavam em MI e 6,5% estavam em MII. Esta elevada porcentagem de oócitos em QVG, em ambos os estudos, está de acordo com o exposto por Aktas et al. (2003), segundo os quais a simples remoção dos COCs do ambiente folicular, resulta no reinício espontâneo da meiose. No entanto, estes resultados diferem do relatado por Han et al. (2006), que observaram que 85% dos oócitos de caprinos estavam em VG, logo após serem removidos dos folículos. Le Beux et al. (2003) também constaram que 86% dos oócitos de suínos estavam em VG e $13,7 \pm 2,2\%$ em QVG, antes de serem submetidos ao processo de maturação *in vitro*. Não foram encontrados estudos similares com COCs de ovinos, o que dificulta a comparação e discussão.

Segundo Jimenez-Macedo et al. (2006), o intervalo de tempo entre a aspiração folicular, a fixação do oócito e avaliação da maturação nuclear em microscópio de fluorescência ou o início do processo de maturação oocitária *in vitro* está diretamente relacionado à maior porcentagem de oócitos nos estádios de quebra de vesícula germinativa, metáfase I e II. No presente estudo, este intervalo de tempo variou de 1 a 2 horas, de acordo com a quantidade de ovários a serem aspirados e de pessoal para auxiliar no processo de aspiração folicular, não ultrapassando 2 horas.

Vale ressaltar ainda que, a classificação dos oócitos de acordo com o estádio de maturação nuclear é visual e subjetiva, podendo haver divergências entre autores. No presente estudo, os oócitos classificados como vesícula germinativa (VG), apresentavam núcleo esférico e definido com carioteca íntegra e filamentos de cromatina descondensados, caracterizado por uma imagem mais homogênea; já aqueles classificados como quebra de vesícula germinativa (QVG), se caracterizavam pela presença do núcleo com carioteca irregular e fragmentada, e filamentos de cromatina bem condensados e facilmente visualizados (MA et al., 2003).

A porcentagem de oócitos degenerados ou não identificados (10,81%) está dentro do esperado e provavelmente está relacionada à coleta aleatória de ovários no abatedouro, independente da idade e condições reprodutiva, nutricional e sanitária da fêmea (CURCIO et al., 2006), e ao fato de todos os folículos visíveis serem aspirados, uma vez que a taxa de recuperação de

COCs de ovinos grau 1 e 2, através de agulha acoplada a seringa, era muito baixa (0,3 por ovário). Este último aspecto também justifica as taxas de 1,35% e 1,01% de oócitos nos estádios de metáfase I e metáfase II, respectivamente, os quais provavelmente eram oriundos de folículos ovulatórios e já haviam reiniciado a meiose.

7.2.b – Inibição meiótica (ETAPA II)

- Grupo Controle: COCs cultivados *in vitro* por 24 horas em meio de maturação padrão isento de fármacos inibidores da meiose.

Os resultados obtidos nos Grupos Controle de ambos os experimentos da Etapa II, que visou avaliar o potencial de retardo meiótico dos fármacos roscovitina e ciclohexemida, foram semelhantes, com média de 5,98% dos oócitos em QVG, 8,13% em MI, 79,90% em MII e 5,98% de oócitos degenerados ou não identificados.

Observa-se que significativa porcentagem de oócitos atingiu o estágio de metáfase II, o que demonstra que as condições de cultivo *in vitro* foram adequadas, permitindo a progressão da maturação nuclear, com baixa taxa de oócitos degenerados ou não identificados. Do mesmo modo como constatado neste estudo, Shi et al. (2009), obtiveram taxas de $2,5 \pm 0,4\%$ de VG; $7,4 \pm 1,2\%$ de QVG; $8,8 \pm 1,8\%$ de MI e $81,3 \pm 0,7\%$ de MII para o grupo controle, que consistiu no cultivo *in vitro* por 24 horas dos COCs de ovinos em meio de maturação constituído por TCM 199, soro de ovelha em estro, albumina sérica bovina, piruvato, FSH, LH, estradiol, penicilina e estreptomicina. Resultado semelhante foi obtido por Shirazi e Sadeghi (2007), que avaliaram a relação entre o diâmetro do oócito (<110 μm , 110-150 μm , >150 μm) e a maturação nuclear e observaram que não houve diferença significativa entre os diferentes diâmetros com relação à taxa de maturação nuclear, que teve como média 3,4% de VG; 4,5% de QVG; 9,5% MI, e 82,3% de MII. Vale ressaltar ainda que, no presente estudo, os oócitos degenerados ou não identificados também foram contabilizados para o cálculo da porcentagem de oócitos em cada estágio de maturação nuclear, diferentemente do observado na maioria dos artigos.

-Roscovitina (Etapa II - primeiro experimento): COCs cultivados *in vitro* por 24 horas na presença de 100 μ M de roscovitina.

Ao se considerar os resultados obtidos nos Grupos Controle da Etapa II, constata-se que a roscovitina, na concentração de 100 μ M, promoveu adequada inibição meiótica com 15,86% dos oócitos mantidos no estadió de quebra de vesícula germinativa e 37,24% em metáfase I.

No entanto, de acordo com os resultados relatados por outros autores em diferentes espécies animais, observa-se que a roscovitina, na concentração em estudo, não foi tão eficiente em retardar a meiose em COCs de ovinos. Albarracín et al. (2005) obtiveram taxa de 64,6% e 63,2% de vesícula germinativa após cultivo *in vitro* de COCs de bovinos, por 24 horas, na presença de 50 e 100 μ M de roscovitina, respectivamente; Krschek e Meinecke (2001) relataram taxa de 85% de VG quando COCs de suínos foram cultivados *in vitro*, por 48 horas, na presença de 50 μ M de roscovitina; Han et al. (2006), obtiveram 78% e 85% de VG, quando COCs de caprinos foram cultivados por 24 horas na presença de 200 μ M e 250 μ M de roscovitina, respectivamente. Esta diferença envolve diversos fatores ainda não esclarecidos, como a espécie animal em estudo, a concentração do fármaco empregada, a origem dos ovários utilizados para recuperação dos COCs, o intervalo de tempo entre aspiração, seleção e início da maturação.

Deve-se considerar ainda que porcentagem relativamente alta de COCs (23,45%) cultivados *in vitro* na presença da roscovitina atingiu o estadió de metáfase II. Este resultado concorda com Jimenez-Macedo et al. (2006) que, avaliando a eficácia de diferentes concentrações de roscovitina em retardar a meiose em COCs de cabras pré-púberes, observaram que a porcentagem de oócitos no estadió de metáfase II foi relativamente alta para todas as concentrações de roscovitina testadas (31,4% de oócitos em MII para 12,5 μ M de roscovitina; 20,8% para 25 μ M; 29,8% para 50 μ M e 22,4% para 100 μ M). Isto se deve provavelmente ao fato da maioria dos oócitos já ter iniciado a meiose antes de ser submetida ao tratamento com o fármaco inibidor da meiose.

O estadió de QVG indica que o processo de divisão meiótica oocitária se reiniciou e, portanto, já ocorreu a desfosforilação dos resíduos treonina e tirosina da subunidade catalítica do MPF e sua consequente ativação

(MONDADORI et al. 1999). Neste contexto, a eficácia do retardo meiótico promovido pela roscovitina se reduz, uma vez que este fármaco, segundo Adona et al., (2008) é um inibidor específico das kinases ciclinas dependentes, que atua justamente impedindo a desfosforilação dos resíduos treonina e tirosina e a consequente ativação do MPF. Esta proteína denominada fator promotor da maturação (MPF) é descrito como um regulador universal do ciclo celular tanto na mitose como na meiose (NURSE, 1990), e quando ativo, promove a dissolução do envoltório nuclear e do nucléolo; condensação cromossômica e reorganização do citoesqueleto (VERDE et al., 1992). Além disso, por se tratar de um inibidor específico das kinases ciclinas dependentes, a roscovitina não impede outros eventos celulares como a síntese e fosforilação de determinadas proteínas que também estão envolvidas com o reinício meiótico e maturação oocitária (VIGNERON et al., 2004).

Estas informações também justificam a maior porcentagem de oócitos no estadio de metáfase I (37,24%) do que em quebra de vesícula germinativa (15,86%) e permite concluir que mesmo na presença da roscovitina, ocorre progressão meiótica, porém, de maneira mais lenta, demonstrando que este fármaco retarda a meiose e não a bloqueia. Do mesmo modo, Lonergan et al. (2003), sugeriram que o bloqueio meiótico promovido pela roscovitina não é absoluto e as fases iniciais da meiose podem ocorrer mesmo na presença deste fármaco.

Com relação à taxa de oócitos degenerados ou não identificados, houve diferença significativa entre o grupo tratado com 100 μ M roscovitina (23,45%) e o grupo controle (5,89%). Da mesma forma como relatado por Albarracín et al. (2005), que obtiveram 5% e 20,8%, de degeneração nos grupos controle e tratado com 50 μ M de roscovitina, respectivamente. Esta elevada porcentagem de oócitos degenerados no grupo tratado com roscovitina deve-se provavelmente ao fato deste fármaco ser diluído em DMSO (dimetilsulfóxido), ou à concentração de roscovitina utilizada. Jimenez-Macedo et al. (2006) também observaram efeito degenerativo quando COCs de cabras pré-púberes foram cultivados *in vitro*, por 24 horas, na presença de roscovitina na concentração de 50 μ M e 100 μ M. Tal efeito, no entanto, não foi verificado para 25 μ M de roscovitina. Estes resultados corroboram com De Azevedo et al., (1997), segundo o qual a toxicidade dos fármacos inibidores da meiose é dose

e tempo-dependente, de modo que quanto maior a concentração do fármaco empregado ou quanto maior a exposição dos COCs a este fármaco, mais intenso será o efeito degenerativo observado.

No entanto, o potencial de ação dos fármacos inibidores da meiose também é dose-dependente, conforme observado por Albarracín et al. (2005) que, em seu experimento com COCs de bovinos pré-púberes, demonstraram que a roscovitina nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M foi mais eficiente em retardar a meiose do que quando em concentrações inferiores (12,5 μ M e 25 μ M). Do mesmo modo, Han et al. (2006) observaram que concentrações mais elevadas de roscovitina (200 μ M e 250 μ M) conferiram maiores taxas de oócitos no estadio de vesícula germinativa do que quando menores concentrações foram utilizadas (100 μ M e 150 μ M). Nos ensaios prévios para execução deste estudo também se constatou que, em COCs de ovinos, a roscovitina em concentrações inferiores a 100 μ M não promoveu adequada inibição meiótica. Portanto, para cada fármaco existe uma faixa de concentração ideal, capaz de retardar a meiose sem promover degeneração e isto parece ser variável entre espécies animais.

Esta evidência de que concentrações mais elevadas de roscovitina promovem retardo meiótico mais eficiente sugere que além do fator promotor da maturação (MPF), outras kinases também estão envolvidas na regulação do reinício meiótico como as MAPK (HAN et al., 2006). Segundo Mermillod et al., (2000), quando em baixas concentrações, a roscovitina inibe apenas a atividade do MPF, no entanto, quando em concentrações mais elevadas, também inibe a atividade da MAPK além do MPF, promovendo retardo meiótico mais efetivo.

Esta divergência com relação à concentração ideal de roscovitina capaz de retardar a meiose oocitária sem prejudicar o posterior desenvolvimento embrionário, em cada espécie animal, envolve ainda uma série de fatores, como origem dos ovários utilizados para recuperação dos COCs, origem do fármaco utilizado, procedimentos para análise dos resultados obtidos, entre outros, ainda desconhecidos (ALBARRACÍN et al., 2005).

Ponderato et al. (2001) propõem ainda a associação da roscovitina com a butirolactona-I, visando a redução da concentração destes fármacos e consequentemente a redução dos efeitos prejudiciais ao desenvolvimento

embrionário. Han et al. (2008), em seus estudos com COCs de caprinos, também relataram que temperaturas de cultivo mais baixas (5°C e 10°C) diminuem o metabolismo celular e a atividade de enzimas envolvidas na progressão meiótica, possibilitando o emprego de menores concentrações de roscovitina para promover o retardo meiótico.

- Ciclohexemida (Etapa II - segundo experimento): COCs cultivados *in vitro* por 24 horas na presença de 1µg/mL de ciclohexemida.

Ao se considerar os resultados obtidos no presente experimento, constata-se que a ciclohexemida na concentração de 1µg/mL promoveu eficiente retardo meiótico, sendo que 84,11% dos oócitos foram mantidos em MI e 6% em QVG, enquanto que, no Grupo Controle, 79,90% dos oócitos alcançaram o estadió de metáfase II, e apenas 5,89% e 8,13% estavam em QVG e MI, respectivamente.

Esta eficiente ação de retardo meiótico promovido pela ciclohexemida também foi relatada por outros autores. Saeki et al. (1997), constataram que o cultivo *in vitro* dos COCs de bovinos, por 24 horas, na presença de 10µg/mL ciclohexemida, impediu a progressão da maturação nuclear em elevada porcentagem dos oócitos analisados, com taxa de 92±4% em VG. Do mesmo modo, Le Beux et al. (2003) relataram que 84±3% dos oócitos de suínos avaliados quanto a maturação nuclear após 24 horas de cultivos *in vitro* na presença de 2µg/mL de ciclohexemida estavam em VG. Já Marques et al. (2007) observaram que 45,5% e 54,5% dos oócitos de suínos estavam nos estadió de VG e QVG, respectivamente, após 10 horas de cultivo *in vitro* na presença de 5µM de ciclohexemida.

Constata-se, no entanto, que os resultados obtidos no segundo experimento da Etapa II diferem daqueles apresentados em outros estudos, quanto à dose de ciclohexemida empregada e quanto ao estadió de bloqueio meiótico promovido por este fármaco.

Fulka et al. (1986) observaram em seus estudos que, sob mesmas condições de cultivo *in vitro*, oócitos de camundongos foram insensíveis à ação da ciclohexemida em diferentes concentrações (1 a 100 µg/mL), enquanto que, em oócito de suínos, 1 µg/mL de ciclohexemida foi suficiente para retardar a meiose. Além disso, relataram que a ciclohexemida nas concentrações de 1, 5,

10, 50 e 100 µg/mL promoveu eficiente retardo meiótico nos COCs de suínos, com taxa em torno de 60% de VG. Estas constatações levaram estes autores a inferir que existe variação entre espécies com relação à concentração e à eficácia da inibição meiótica promovida pela ciclohexemida. Estas informações permitem prever que COCs de ovinos, assim como os de suínos, provavelmente são mais sensíveis à ciclohexemida, uma vez que, no presente estudo, 1µg/mL foi suficiente para promover eficiente retardo meiótico.

De acordo com Tatemoto et al. (1994), a síntese protéica nos oócitos e a transcrição RNA nas células do *cumulus* são necessárias para que ocorra a quebra da vesícula germinativa, ou seja, o reinício da maturação nuclear, sendo que a contínua síntese protéica é indispensável para progressão as divisões meióticas oocitárias. Baseado nisto, pode-se inferir que a elevada taxa de COCs bloqueados no estadio de MI (84,11%), verificada no segundo experimento da Etapa II, deve-se ao fato da grande maioria dos oócitos já ter reiniciado a meiose antes de ser submetida ao tratamento com o fármaco inibidor da meiose. Deste modo, a ciclohexemida que é um inibidor da síntese protéica, não pôde impedir a quebra da vesícula germinativa, a qual já havia ocorrido, mas inibiu de maneira eficaz a progressão da maturação nuclear.

Considerando a taxa de oócitos degenerados ou não identificados, observa-se que não houve diferença significativa entre o grupo de COCs tratados com a ciclohexemida (10,33%) e o grupo controle (5,98%), o que demonstra a baixa toxicidade deste fármaco, provavelmente devido à baixa concentração empregada. Vale ressaltar ainda que, a maioria dos estudos não faz referência à proporção de oócitos degenerados ou não identificados o que dificulta a interpretação dos resultados.

7.2.c-Reversibilidade da inibição meiótica (Etapa III)

- Grupo controle: COCs cultivados *in vitro* por 46 horas em meio de maturação livre de fármacos inibidores da meiose.

Este grupo experimental foi instituído com objetivo de estabelecer um padrão de referência para comparação com os resultados de reversibilidade meiótica obtidos nos grupos tratamentos com roscovitina ou ciclohexemida.

Os resultados obtidos nos grupos controle de ambos os experimentos da Etapa III, que visou avaliar a reversibilidade do retardo meiótico promovido

pelos fármacos roscovitina e ciclohexemida, foram semelhantes, com média de 76,39% dos oócitos em metáfase II ao final das 46 horas de cultivo *in vitro*. Vale ressaltar ainda que a taxa de oócitos classificados como degenerados ou não identificados foi baixa (7,48%) o que demonstra que o tempo prolongado de cultivo *in vitro* não foi prejudicial para maturação nuclear, quando analisada em microscópio de fluorescência. Resultados semelhantes foram relatados por Adona e Leal (2004) e Albarracín et al. (2005) e em seus estudos com COCs de bovinos, com taxa de $82,5 \pm 1,2\%$ e 74,5% de MII, respectivamente, após o cultivo *in vitro* por mais 24 horas na ausência da roscovitina.

Ainda, ao se considerar os resultados obtidos após 24 horas de cultivo *in vitro* na ausência dos fármacos inibidores da meiose (grupos controle da Etapa II), observa-se que não houve variação significativa quanto à porcentagem de oócitos em cada estadio da maturação nuclear, demonstrando que o cultivo *in vitro* por 46 horas não interferiu na configuração cromossômica dos COCs de ovinos, quando analisados em microscopia de fluorescência.

- Roscovitina (Etapa III - primeiro experimento): COCs cultivados *in vitro* por 46 horas, sendo 24 horas na presença de 100 μM de roscovitina seguido por 22 horas em meio de maturação livre de fármacos inibidores da meiose.

Ao se considerar os resultados obtidos no grupo controle, em que 76,39% dos oócitos estavam em MII após 46 horas de cultivo *in vitro* na ausência de fármacos inibidores da meiose, se constata que a reversibilidade do retardo meiótico promovido pela roscovitina foi eficiente, uma vez que 60% dos oócitos alcançaram o estadio de MII, sendo que 12% permaneceram em MI e 10% em QVG.

Estes resultados concordam com alguns autores como Donnay, et al. (2004), segundo os quais, 60% dos COCs de bovinos pré-púberes estavam em metáfase II após a pré-maturação por 24 horas na presença de 50 μM de roscovitina seguida pelo cultivo *in vitro* por mais 22 horas na ausência deste fármaco inibidor da meiose; e Albarracín et al. (2005) que, trabalhando com COCs de bovinos pré-púberes, relataram reversibilidade do retardo meiótico promovido pela roscovitina nas concentrações de 25 μM , 50 μM e 100 μM , com

taxa aproximada de 70% de oócitos em MII, para todas as concentrações testadas, após 24 horas de cultivo na ausência deste fármaco inibidor.

Outros autores, contudo, obtiveram melhores taxas de reversibilidade como Adona e Leal (2004) que, em seus estudos com COCs de bovinos, constataram taxa de $96,0 \pm 2,1\%$ de MII após 24 horas de cultivo *in vitro*, na presença de 25 μM de roscovitina, seguido por 18 horas na ausência de tal inibidor; e Romar et al. (2006) que, trabalhando com COCs de suínos, relataram taxa de 92,1% de em MII, após 48 horas de pré-maturação com 50 μM de roscovitina, seguido por 44 horas de cultivo *in vitro* em meio de maturação livre de fármacos. Segundo Han et al. (2006), tanto a eficiência do retardo meiótico como a reversibilidade da ação do fármaco inibidor da meiose são dose e tempo-dependente. Além disso, esta divergência de resultados envolve diversos fatores como a espécie animal em estudo, os constituintes do meio de maturação, a origem dos ovários utilizados para recuperação dos COCs, entre outros.

No primeiro experimento da Etapa III, também foi constatada considerável proporção de oócitos degenerados ou não identificados (18%) que, no entanto, não diferiu significativamente do observado no grupo controle (7,48%). Vale ressaltar que a maioria dos artigos não relata a proporção de oócitos degenerados, dificultando possíveis comparações.

Alguns estudos relatam ainda que o reinício meiótico após a remoção do fármaco inibidor da meiose é acelerado, sendo que os oócitos atingem o estadió de metáfase II mais rapidamente, permitindo inferir que o tempo de cultivo *in vitro* na ausência de tais fármacos pode ser reduzido (HAN et al. 2006 e 2008; ADONA & LEAL, 2004). No entanto, ainda existe controvérsia entre os autores com relação à cinética da maturação nuclear.

- Ciclohexemida (Etapa III - segundo experimento): COCs cultivados *in vitro* por 46 horas, sendo 24 horas na presença de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ciclohexemida seguido por 22 horas em meio de maturação livre de fármacos inibidores da meiose.

Do mesmo modo como constatado para roscovitina, a reversibilidade do retardo meiótico promovido pela ciclohexemida pode ser considerada eficiente, uma vez que 60,95% dos oócitos alcançaram o estadió de MII, o que não

diferiu significativamente do Grupo Controle, em que 76,39% dos oócitos estavam em MII após 46 horas de cultivo *in vitro* na ausência de fármacos inibidores da meiose.

Estes resultados estão de acordo com Le Beux et al. (2003) que, trabalhando com COCs de suínos, obtiveram taxa de 60% de oócitos no estadio de metáfase II após 48 horas de cultivo *in vitro*, sendo 24 horas na presença de 2µg/mL de ciclohexemida e 24 horas na ausência deste fármaco. Do mesmo modo, com COCs de suínos, Marques et al. (2007) relataram que 70,29% dos COCs alcançaram o estadio de MII após 44 horas de cultivo *in vitro*, sendo 10 horas na presença de 5 µM de ciclohexemida. Segundo estes autores, os resultados obtidos permitem inferir que a reversibilidade de ação da ciclohexemida foi eficaz.

Vale ressaltar que a taxa de oócitos classificados como degenerados ou não identificados (4,75%) não diferiu da observada no grupo controle (7,48%), o que permite predizer que o tratamento com a ciclohexemida por 24 horas e o cultivo prolongado por 46 horas não foram prejudiciais para os COCs em termos da maturação nuclear, quando analisada em microscópio de fluorescência.

Takayama et al. (2006), em seu estudo com COCs de bovinos, constaram ainda que o reinício meiótico após a remoção da ciclohexemida do meio de cultivo é acelerado, sendo que os oócitos alcançaram o estadio de MII após 16 horas de cultivo na ausência deste fármaco. No entanto, apesar desta constatação, o tempo de cultivo *in vitro* deve ser suficiente para que haja adequada progressão da maturação citoplasmática.

7.2.d- Comparação da eficiência e reversibilidade da inibição meiótica promovida pela roscovitina e ciclohexemida.

Os resultados obtidos demonstram que ambos os fármacos promoveram adequado retardo da progressão meiótica oocitária. No entanto, o cultivo *in vitro*, por 24 horas, na presença de 100µM de roscovitina resultou em maior proporção dos COCs no estadio de quebra de vesícula germinativa enquanto, na presença de 1µg/mL de ciclohexemida, se obteve maior proporção de COCs no estadio de metáfase I. Ao se considerar ainda a taxa de COCs que alcançaram o estadio de metáfase II e que degeneraram após 24 horas de

cultivo *in vitro* na presença destes fármacos, consta-se que a ciclohexemida foi mais eficiente em retardar a progressão da maturação nuclear.

A discrepância dos resultados com relação à inibição da maturação nuclear provavelmente está relacionada à concentração e ao modo de ação dos fármacos em estudo (DE AZEVEDO et al., 1997), uma vez que a roscovitina é um inibidor específico das kinases ciclinas dependentes enquanto a ciclohexemida é um inibidor da síntese protéica. Com relação à reversibilidade da inibição meiótica, ambos os fármacos apresentaram o mesmo potencial que, de acordo com os relatos da literatura, pode ser considerada eficiente (LE BEUX et al., 2003; DONNAY et al., 2004). Vale ressaltar ainda que há escassez de informação referente a ação destes inibidores da meiose em COCs de ovinos, o que dificulta a interpretação e discussão dos resultados. Além disso, novos estudos são necessários para avaliar a influência dos tratamentos com roscovitina e ciclohexemida e do bloqueio meiótico nos estádios de quebra de vesícula germinativa e metáfase I sobre o potencial de desenvolvimento dos COCS de ovinos.

7.3- Maturação citoplasmática

7.3.a – Análise das características ultraestruturais dos COCs de ovinos antes (imaturos) e após (maturados) o cultivo *in vitro* por 24 horas em meio de maturação padrão livre de fármacos inibidores da meiose.

-Espaço perivitelínico

O espaço perivitelínico está relacionado ao bloqueio da poliespermia, e começa a surgir entre a zona pelúcida e oócito apenas nos estágios finais da foliculogênese, se tornando mais evidente no folículo dominante, após o pico de LH, quando o oócito inicia a finalização do processo de maturação (ASSEY et al., 1994). Portanto, a análise ultraestrutural de COCs recém-aspirados, revela espaço perivitelínico muito pequeno ou ausente (HYTTEL et al., 1986 e 1989), conforme constatado no presente estudo, em que os COCs analisados antes de serem submetidos à maturação *in vitro* exibiram espaço perivitelínico pouco desenvolvido e atravessado por poucas e pequenas microvilosidades da

membrana plasmática do oócito. Deve-se considerar, no entanto, que o processo de preparação da amostra de COCs a ser analisada em microscopia eletrônica de transmissão inclui a desidratação em uma série crescente de acetona (70%, 90% e 100%), o que pode provocar ligeira retração do ooplasma.

Ao longo do processo de maturação oocitária *in vitro* assim como após o estímulo gonadotrófico *in vivo*, há aumento do espaço perivitelinico (MONDADORI, 2008) como constatado neste estudo, em que os COCs que foram cultivados *in vitro* por 24 horas em meio de maturação padrão sem adição de fármacos apresentavam espaço perivitelinico mais desenvolvido preenchido por grande quantidade de microvilosidades da membrana plasmática do oócito.

- Mitocôndrias e grânulos de lipídeo

Segundo Stojkovic et al. (2001), as mitocôndrias são responsáveis pelo suprimento de ATP para síntese de proteínas que darão suporte à conclusão dos processos de maturação e ao desenvolvimento embrionário subsequente. Portanto, o deslocamento das mitocôndrias para áreas de maior consumo de energia é crucial para os oócito e blastocistos durante os períodos críticos do ciclo celular. De acordo com Hyttel et al.(1986), ao longo do processo de maturação oocitária *in vitro* e *in vivo*, as mitocôndrias se movimentam de uma posição mais periférica para uma distribuição mais espacial, sendo que após a extrusão do corpúsculo polar, se encontram dispersas por todo ooplasma. Estudos recentes demonstram ainda que, durante a maturação oocitária, há aumento da quantidade de mitocôndrias para sustentar as demandas energéticas durante o início do desenvolvimento embrionário (SHOUBRIDGE et al., 2007).

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com a literatura, uma vez que, nos COCs recém-aspirados foram observados aglomerados de mitocôndrias concentrados na periferia do ooplasma, enquanto que os COCs maduros, ou seja, após 24 horas de cultivo *in vitro* na ausência de inibidores da meiose, apresentavam maior quantidade de mitocôndrias uniformemente distribuídas por todo ooplasma.

Do mesmo modo como constatado por Máximo (2009), em COCs de ovinos, as mitocôndrias eram pleomórficas, algumas com formato de ferradura ou com projeções em forma de arco, o que confere maior superfície mitocondrial e provavelmente está relacionado ao alto metabolismo oocitário ao longo do processo de maturação.

O metabolismo celular dos oócitos que ainda não completaram seu desenvolvimento é mais elevado uma vez que estão passando por transformações citoesqueléticas e bioquímicas relacionados ao processo de maturação. Devido a isso, nos COCs analisados antes de serem submetidos à maturação *in vitro* e, portanto, considerados imaturos, constatou-se grande quantidade de mitocôndrias associadas aos grânulos de lipídeo e ao retículo endoplasmático constituindo as unidades funcionais ou metabólicas, que estão relacionadas à síntese de energia e proteínas (SENGER & SAACKE, 1970). Estas unidades metabólicas se concentravam principalmente na periferia do oócito o que denota alta taxa de troca entre o oócito e células do *cumulus*, bem como intensa síntese de grânulos corticais (MONDADORI, 2008).

Além disso, nos COCs imaturos, foi constatada a presença de vesículas cobertas, que consistem numa forma de internalização e estoque de material, e de figuras mielínicas, que consistem em grânulos de lipídeo com conteúdo membranoso no seu interior e indicam metabolização de lipídeos (COOPER & HAUSMAN, 2007). Estas estruturas também estão relacionadas ao alto metabolismo oocitário.

Os grânulos de lipídeos correspondem a estoques de energia e, ao longo do processo de maturação oocitária, são metabolizados para síntese de fosfolipídeos que entrarão na constituição de organelas e membranas citoplasmáticas, assim como na constituição do embrião (WU et al., 2006). Portanto, a presença de grande quantidade destes grânulos é um importante indício de imaturidade e de alto metabolismo oocitário. Segundo Máximo (2009), com a progressão da maturação, este elevado metabolismo tende a reduzir.

Nos COCs dos grupos controles de ambos os experimentos da Etapa II desta pesquisa, que foram cultivados *in vitro* por 24 horas em meio de maturação padrão livre de fármacos inibidores da meiose, foi constatada pouca quantidade de grânulos de lipídeos em contraste à elevada quantidade de

figuras mielínicas, o que indica que grande parte dos grânulos de lipídeo foram metabolizados durante o processo de maturação oocitária concordando com a literatura.

- Retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático está envolvido na síntese e degradação protéica, no metabolismo lipídico e síntese de membranas entre outras importantes funções (LIPPINCOTT-SCWAZTZ et al., 2000). Nos oócitos imaturos, o retículo endoplasmático está uniformemente disperso por todo ooplasma e conforme há a progressão da maturação, há tendência à maior concentração desta organela na região cortical do oócito e à formação de alomerados de retículo endoplasmático por todo citoplasma (KLINE, 2000; STRICKER, 2006).

No presente estudo, a análise ultraestrutural dos oócitos imaturos e maturos revelou grande quantidade de retículo endoplasmático tanto associado às mitocôndrias e aos grânulos de lipídeos como disperso no ooplasma. Desta forma, observa-se que a distribuição do retículo endoplasmático não se alterou durante o processo de maturação oocitária, discordando dos relatos encontrados na literatura.

- Complexos de Golgi e grânulos corticais

O complexo de Golgi é responsável pela secreção dos grânulos corticais e das proteínas da zona pelúcida (HYTTEL et al., 1997), no entanto, ainda não se conhece a dinâmica das membranas do complexo de Golgi e sua importância direta tanto na maturação do oócito, quanto na fertilização e embriogênese inicial (MORENO et al., 2002). Sabe-se, contudo, que no oócito imaturo o complexo de Golgi é bem desenvolvido e se localiza na periferia celular próximo aos grânulos corticais. Conforme há a progressão da maturação nuclear, ele diminui de tamanho e praticamente desaparece (SILVA, 2008), como constatado no presente experimento,

Com relação aos grânulos corticais (CGs), seu padrão de distribuição é considerado um dos principais critérios para avaliação do processo de maturação citoplasmática, uma vez que corresponde à mudança ultraestrutural mais aparente e está relacionado ao bloqueio à poliespermia (ASSEY et al., 1994; HYTTEL et al., 1997)

Como já dito anteriormente, os grânulos corticais são organelas derivadas do complexo de Golgi, constituídas por grande diversidade de proteínas, moléculas estruturais, enzimas e glicosaminoglicanos, encontradas exclusivamente nos oócitos, sendo responsáveis pela reação cortical que impede a poliespermia (FERREIRA et al., 2008).

Nos oócitos em estadio de vesícula germinativa, os grânulos corticais estão distribuídos, em grumos, por todo citoplasma (HOSOE & SHYOIA, 1997). Ainda segundo Hyttel et al., (1997), em oócitos imaturos, os grânulos corticais também podem estar localizados em aglomerados na periferia do oócito. Conforme há progressão da maturação, ocorre a migração destes grânulos em direção ao córtex do oócito, sendo que , quando o oócito alcança o estadio de MII, os CGs estão isolados e alinhados à superfície interna da membrana plasmática (CONNER et al., 1997; THIBAUT, 1987) formando uma monocamada estratégica para aguardar a penetração do espermatozóide (CARNEIRO et al., 2002). Este padrão de distribuição dos grânulos corticais, nos COCs imaturos e maduros foi constatado no presente estudo.

Caso haja a penetração espermática do óvulo, ocorre a fusão dos grânulos corticais à membrana plasmática, resultando na exocitose dos seus conteúdos (CARNEIRO et al., 2002), Este evento é conhecido como reação cortical, sendo um dos mecanismos para impedir a poliespermia, a qual resultaria em clivagem anormal do zigoto e degeneração embrionária (FERREIRA et al., 2008).

Portanto, o conjunto de sinais indicativos de imaturidade e maturidade oocitária observados nos COCs de ovinos antes e após (Fig.7 e 8), respectivamente, o cultivo *in vitro* por 24 horas em meio de maturação padrão (item 5.2) isento de inibidores da meiose está de acordo com o esperado e com os relatos encontrados na literatura para outras espécies de mamíferos (bovino: NAGANO et al., 2006; ovino: O'BRIEN et al., 2005; eqüino: ALVARENGA, 2006; suíno: CRAN,1985; búfalo: MONDADORI, 2008).

7.3.b- Maturação citoplasmática dos COCs cultivados *in vitro*, por 24 horas, na presença de 100µM de roscovitina ou 1µg/mL de ciclohexemida.

A análise ultraestrutural dos COCs de ovinos demonstrou que, o cultivo *in vitro* por 24 horas na presença de 100µM de roscovitina promoveu retardo na progressão da maturação citoplasmática, que revelou sinais de maturidade e imaturidade, e degeneração nas células do *cumulus*, enquanto que na presença de 1µg/mL de ciclohexemida houve adequada progressão da maturação citoplasmática e ausência de sinais de degeneração tanto nas células do *cumulus*, como no ooplasma e nas organelas citoplasmáticas.

Os sinais de degeneração e a pequena expansão das células do *cumulus* observados nos COCs de ovinos cultivados na presença de 100µM de roscovitina concordam com Lonergan et al. (2003) que constataram que a roscovitina na concentração de 125µM provocou degeneração das células do *cumulus* de COCs de bovinos; e com Mermillod et al. (2000) que relataram que a expansão do *cumulus* foi inibida quando COCs de bovinos foram cultivados, por 24 horas, na presença de 25µM deste fármaco. Esta degeneração das células do *cumulus* pode ter contribuído para o retardo da progressão da maturação citoplasmática, uma vez que estas células desempenham importante função ao longo de todo processo da maturação oocitária.

Na presença da roscovitina, os COCs apresentaram dilatação do retículo endoplasmático, vesículas elétron-lucentes com conteúdo eletron-denso e mitocôndrias com menor eletrondensidade e com pontos enegrecidos, que correspondem à cristais. Tais alterações não foram constatadas nos COCs cultivados na presença da ciclohexemida, que apresentaram características de maturidade semelhantes às verificadas nos grupos controle da Etapa II, no qual os COCs foram cultivados por 24 horas em meio de maturação padrão isento de inibidores da meiose. Esta diferença de resultados pode estar relacionada à concentração utilizada e ao modo de ação dos fármacos em estudo.

7.3.c- Maturação citoplasmática dos COCs cultivados *in vitro*, por 46 horas, sendo 24 horas na presença de 100 µM de roscovitina ou 1µg/mL de ciclohexemida e 22 horas na ausência destes fármacos.

A análise ultraestrutural dos COCs de ovinos tratados com roscovitina demonstrou que não houve progressão da maturação citoplasmática mesmo após o cultivo *in vitro* por mais 22 horas na ausência deste inibidor da meiose. Além disso, assim como nos COCs dos Grupos Controle da Etapa III, foi constatada degeneração do oócito e das células do *cumulus*, do mesmo modo como relatado por Lonergan et al. (2003). Estes sinais de degeneração indicativos de envelhecimento celular estão de acordo com o esperado, já que o tempo adequado para a maturação *in vitro* de COCs de ovinos varia de 24 horas (SHI et al. 2009) a 26-27 horas (SHIRAZI & SADEGHI, 2007). Vale ressaltar, no entanto, que o presente estudo não visou avaliar o efeito do tempo de cultivo *in vitro* sobre as características citoplasmáticas e nucleares dos COCs de ovinos, o qual foi instituído baseado em informações obtidas na literatura disponível.

Em contraste, os COCs tratados por 24 horas com ciclohexemida e posteriormente cultivados *in vitro* por mais 22 horas na ausência deste fármaco, apresentaram características de maturidade e ausência de quaisquer sinais de degeneração e envelhecimento celular no oócito ou nas células do *cumulus*. No entanto, foi detectada grande quantidade de grânulos de lipídeos uniformemente distribuídos por todo ooplasma que, por se tratar de um sinal isolado de imaturidade, provavelmente consiste numa característica individual dos COCs analisados neste experimento. Vale ressaltar ainda que as informações disponíveis na literatura relatam apenas o efeito da ciclohexemida sobre a estrutura nuclear (FAEGER et al., 2001), o que dificulta a discussão dos resultados obtidos neste estudo.

Constata-se, portanto, que a ciclohexemida diferentemente da roscovitina, não interferiu na maturação citoplasmática, que progrediu adequadamente, e ainda parece ter exercido efeito protetor contra o envelhecimento celular. Esta diferença de resultados pode estar relacionada ao modo de ação e à concentração utilizada de cada fármaco em estudo, ao tempo de exposição dos COCs a estes fármacos aliado ao tempo de cultivo *in vitro*, e à origem dos ovários, que era desconhecida.

8 – IMPLICAÇÕES

- A dificuldade de obtenção de ovários de ovinos consistiu numa das limitações para execução de ensaios prévios a este estudo. A concentração dos inibidores da meiose e o tempo de tratamento foram baseados principalmente em informações disponíveis na literatura. Foram realizados apenas alguns testes pilotos com poucas rotinas para determinação da concentração supostamente ideal de roscovitina e ciclohexemida para a inibição da meiose em COCs de ovinos. Considerando ainda a escassez de estudos similares com COCs de ovinos, constata-se a necessidade de realização de novos estudos visando à melhor adequação da concentração destes inibidores e do tempo de tratamento e exposição dos COCs de ovinos às condições de cultivo *in vitro*.

- A baixa eficiência de recuperação dos COCs graus 1 e 2 de ovinos (03 por ovário) e a elevada proporção de oócitos desnudos constatados neste estudo permitem especular que as células do *cumulus* de COCs de ovinos tem menor adesividade sendo necessário rigoroso controle da pressão de aspiração folicular.

- A elevada taxa de oócitos em metáfase II (79,90%) associada aos sinais característicos de maturidade citoplasmática observados nos COCs dos grupos controle da etapa II, que foram cultivados *in vitro* por 24 horas em meio de maturação isento de inibidores, contradizem a hipótese proposta neste estudo e, provavelmente, estão relacionados à rigorosa seleção dos COCs, de acordo com a presença das células do cumulus e características do ooplasma.

- A elevada taxa de oócitos em quebra de vesícula germinativa (83,11%) antes do início do cultivo *in vitro* pode estar relacionada ao intervalo de tempo entre a obtenção dos ovários em abatedouro até a recuperação e fixação dos oócitos para avaliação da maturação nuclear. Vale ressaltar que a maioria dos artigos consultados não relata as condições prévias dos oócitos. Especula-se

que a inibição meiótica no estadió de vesícula germinativa será mais eficiente quanto mais imediata for a exposição dos COCs a estes inibidores da meiose.

- Apesar da maioria dos oócitos já ter iniciado a meiose (83,11%) antes do cultivo *in vitro*, ambos os inibidores (roscovitina e ciclohexemida) promoveram adequado bloqueio meiótico, com os oócitos bloqueados nos estadios de quebra de vesícula e metáfase I. No tratamento com ciclohexemida, na concentração de 1µg/mL, houve adequada progressão da maturação citoplasmática durante o bloqueio meiótico dos oócitos em metáfase I, confirmando a hipótese proposta neste estudo. No entanto, apesar da reversibilidade da inibição meiótica em ambos os tratamentos (roscovitina e ciclohexemida), novos estudos são necessários para avaliar o efeito do bloqueio meiótico em QVG e MI sobre os posteriores estadios de desenvolvimento.

- A maturação oocitária, o potencial de ação e a reversibilidade da inibição meiótica promovida da pelos fármacos em estudo, foram determinados a partir da avaliação da maturação nuclear, em microscopia de fluorescência, e da avaliação da maturação citoplasmática, em microscopia eletrônica de transmissão. Novas pesquisas são necessárias a fim de avaliar os efeitos destes inibidores da meiose quanto aos aspectos moleculares da maturação molecular.

- Embora o cultivo *in vitro* dos COCs de ovinos com roscovitina ou ciclohexemida não tenha incrementado os resultados da maturação oocitária, somente o parâmetro da maturação não é suficiente para descartar a hipótese proposta e contestar a aplicabilidade do uso de inibidores da meiose na PIV de ovinos.

9 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem inferir que:

- O tratamento com 100 μ M de roscovitina promoveu adequada e reversível inibição meiotica nos oócitos de ovinos, no entanto, também interferiu, de maneira irreversível, nas células do *cumulus* que não expandiram e apresentaram sinais de degeneração; e na ultraestrutura dos oócitos, que resultou em inadequada progressão da maturação citoplasmática;
- O tratamento com 1 μ g/mL de ciclohexemida promoveu adequada e reversível inibição meiotica nos oócitos de ovinos. Além disso, não interferiu nas células do *cumulus*, que expandiram após a remoção deste inibidor da meiose; e nem na ultraestrutura dos oócitos, havendo adequada progressão da maturação citoplasmática. Logo, o tratamento de COCs de ovinos com ciclohexemida, na concentração de 1 μ g/mL, confirmou a hipótese proposta no presente estudo;
- As condições de cultivo *in vitro* foram adequadas, uma vez que permitiram a expansão total do *cumulus* e a progressão da meiose em elevada proporção dos COCs do grupo controle que também apresentaram sinais característicos de maturidade citoplasmática, ao final das 24 e 46 horas de cultivo *in vitro*;
- O tempo de cultivo *in vitro* prolongado (46 horas) foi prejudicial aos COCs de ovinos, uma vez que resultou em sinais de degeneração e apoptose tanto no ooplasma como nas células do *cumulus*;
- Apesar das informações e esclarecimentos obtidos no presente estudo ainda há escassez de informações referentes ao uso de inibidores da meiose em COCs de ovinos e aos efeitos desses fármacos sobre a ultraestrutura dos oócitos, sobre a expansão do *cumulus* e sobre os posteriores estádios de desenvolvimento.

10 - REFERÊNCIAS

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 roscovitine. **Anim. Reprod. Sci.**, v.104, p.389-397, 2008.

AKTAS, H.; M. LEIBFRIED-RUTLEDGE, L.; FIRST, N. L. Meiotic State of Bovine Oocytes Is Regulated by Interactions Between cAMP, *Cumulus*, and Granulosa. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 65, p.336–343, 2003.

ALBARRACIN, J.L.; MORATO, R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T. Effects of roscovitine on the nuclear and cytoskeletal components of calf oocytes and their subsequent development. **Theriogenology**, v.64, p.1740–1755, 2005.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia molecular da célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, p.1044-1045.

ALM, H.; TORNER, H.; LOHRKE, B.; VIERGUTZ, T.; GHONEIM, I.M.; KANITZ, W. Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Theriogenology**, v.63, p.2194–2205, 2005.

ALVARENGA, F.C.L. Structural aspects of equine oocytes matured in vivo and in vitro. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 23, p.513-524, 2006.

ARAÚJO, C.H.M.; ARAÚJO, M.C.P.; MARTINS, W.P.; FERRIANI, R.A.; REIS, R.M. Gametogênese: Estágio fundamental do desenvolvimento para reprodução humana. **Medicina**, v.40, n.4, p.551-558, 2007.

ARMSTRONG, D.G.; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. **Rev. Reprod.**, v.2, p.139-146, 1997.

ARMSTRONG, D. T. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. **Theriogenology**, v.55, p.1303-1322, 2001.

ASSEY, R.J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; PURWANTARA, B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 37. p.335-344, 1994.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; GAUTHIER, M.; NEVEU, N.; LAPOINTE, J.; SNEEK, L.; LEDUC, M.; DUGUA, Y.F.; ZHOU, J.F.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of *in vitro* produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. **Theriogenology**, v.56, p.831–839, 2003.

BALDASSARRE, H. Tecnologias reprodutivas de última geração. In: AISEN, E.G. **Reprodução ovina e caprina**, São Paulo: MedVet, 2008, p.179-183.

BALL, G.D.; BELLIN, M.E.; AX, R.L.; FIRST, N.L. Glycosaminoglycans in bovine cumulus-oocyte complexes: morphology and chemistry. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.28, p. 113–122, 1982.

BARNETT, K.R.; SCHILLING, C.C.R.; GREENFELD, C.R.; TOMIC, D.; FLAWS, J.A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Hum Reprod**, v.10, p.1-19, 2006.

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*. **Anim. Reprod. Sci.**, v.99, p.202–207, 2007.

BAVISTER, B. D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Hum. Reprod. Update**, v.1, p.91–148, 1995.

BEEBE, S. J.; CORBIN, J. D. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. In: Boyer, P. & Krebs, E. (Eds.) "The Enzymes", v.17A, Academic Press, Orlando, 1986, p. 43–111.

BEVERS, M.M. et al. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v.47, p.13-22, 1997.

BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. **Anim. Reprod. Sci.**, v.71, p.143–155, 2002.

BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Mol. Reprod. and Dev.**, v.41, p.54-62, 1995.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L.A.; SIRARD, M.A. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, v.47, p.1061-1075, 1997.

BOLS, P.E.J. Puncture of immature ovarian follicles in bovine assisted reproduction. **Verh. K. Acad. Geneesk. Belg.**, v.67, n.3, p.177– 202, 2005

BREVINI-GANDOLFI, T.A.; FAVETA, L.A.; MAURI, L.; LUCIANO, A.M.; CILLO, F.; GANDOLFI, F. Changes in poly (A) tail length of maternal transcripts during in vitro maturation of bovine oocytes and their relation with developmental competence. **Mol. Reprod. Dev.**, v.52, p. 427-233, 1999.

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

BURATINI, J. Júnior. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.190-196, 2007.

BYSKOV, A.G.; YDING-ANDERSEN, C.; HOSSAINI, A.; GUOLIANG, X. Cumulus cells of oocyte–cumulus complexes secrete a meiosis activating substance when stimulated with FSH. **Mol. Reprod. Dev.**, v.46, p.296–305, 1997.

CAMPBELL, J.S.; SEGER, R.; GRAVES, J.D.; GRAVES, L.M.; JENSEN, A.M.; KREBS, E.G. The MAP kinase cascade. **Recent. Prog. Horm. Res.**, v. 50, p.131-159, 1995

CARNEIRO, G.F.; LIU, I.K.M.; HYDE, D.; ANDERSON, G.B.; LORENZO, P.L., BALLI, B.A. Quantification and Distribution of Equine Oocyte Cortical Granules During Meiotic Maturation and After Activation. **Mol. Reprod. Dev.**, v.63, p.451–458, 2002.

CARNEVALE, E.M. Gamete intrafallopian transfer. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v.12, p.47-60, 1996.

CHAVES, R.N.; DUARTE, A.B.G.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO, J.R. Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.34, n.1, p.37-49, 2010.

CHEN, L.; WERT, S.E.; HENDRIX, E.M.; RUSSELL, P.T.; CANNON, M.; LARSEN, W.J. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. **Mol. Reprod. Dev.**,v.26, p.236–247,1990.

CHERR, G.; DROBINS, E.; KATZ D. Localization of cortical constituents before and after exocytosis in hamster egg. **J Exp Zool.**, v.26, p.81-93, 1998.

COMBELLES, C.M.; RACOWSKY, C.; ALBERTINI, D.F. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. **Hum. Reprod.**, v.17, p.1006-1016, 2002.

CONNER, S.; LEAF, D.; WESSEL, G. Members of the SNARE hypothesis are associated with cortical granule exocytosis in the sea urchin egg. **Mol. Reprod. Dev.**, v.48, p.106–18,1997.

COOPER, G.M.; HAUSMAN, R.E. The Cell: A Molecular Approach. 4^a edição. ASM Press, Washington, DC. 2007.

CORCORAN, D.; FAIR, T.; LONERGAN, P. Predicting embryo quality: mRNA expression and the preimplantation embryo. **Reprod. Biomed. Online**, v.11, p.340–348, 2005.

CRAN, D.G. Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. **J. Reprod. Fert.**, v.74, p.237-245, 1985.

CURCIO, B. R.; LEON, P. M. M.; JUNIOR, F. F.; NOGUEIRA, C. E. W., DESCHAMPS, J. C. Eqüinos: oogênese, foliculogênese e maturação. **Ver. Brás. Reprod. Anim.**, v.30, n.1/2, p.28-35, 2006.

DAMIANI, P.; FISSORE, R.A.; CIBELLI, J.B.; LONG, C.R.; BALISE, J.J.; ROBL, J.M.; DUBY, R.T. Evaluation of developmental competence, nuclear, and ooplasmic maturation of calf oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v.45, p.521-534,1996.

DE AZEVEDO, W.F.; LECLERC, S.; MEIJER, L.; HAVLICEK, L.; STRNAD, M.; KIM, S.H.. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: Crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. **Eur. J. Biochem.**, v.243, p.518–526, 1997.

DEKEL, N.; LAWRENCE, T.S.; GILULA, N.B.; BEERS, W.H. Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus–oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. **Dev. Biol.**, v.86, p.356–362, 1981.

DEKEL, N.; GAKLIANI, D.; BEERS, W. Induction of maturation in follicle-enclosed oocytes: the response to gonatropins at different stages of follicular development. **Biol. Reprod.** v.38, p.517–521, 1988.

DEKEL, N. Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. **Rev. Reprod.**, v.1, p.82-88, 1996.

DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanism regulating oocyte maturation. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.234, n.1-2, p.19-25, 2005.

DE VANTERY, C.; GAVIN, A. C.; VASSALLI, J.D.; SCHORDERET-SLATKINE, S. An accumulation of 34 cdc2 at the end of mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. **Dev. Biol.**, v. 174, p.335-344, 1996.

DONG, J.; ALBERTINI, D.F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T.R.; LU, N.; MATZUK, M.M. Growth differentiation factor-9 required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v.383, p.531- 535,1996.

DONNAY, I.; FAERGE, I.; GRØNDAHL, C.; VERHAEGHE, B.; SAYOUD, H.; PONDERATO, N.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Effect of prematuration, meiosis activating sterol and enriched maturation medium on the nuclear maturation and competence to development of calf oocytes. **Theriogenology**, v.62, p.1093–1107, 2004.

DOWNS, S. M.; DUNN, H. M. Differential Regulation of Oocyte Maturation and Cumulus Expansion in the Mouse Oocyte– Cumulus Cell Complex by Site-Selective Analogs of Cyclic Adenosine Monophosphate. **Dev. Biol.**, v.172, p.72–85, 1995.

EPPIG, J.J. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. **Bioessays**, v.13, p.569-574, 1991.

EPPIG, J.J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.8, p.485-489, 1996.

FAERGE, I.; MAYES, M.; HYTTEL, P.; SIRARD, M.A. Nuclear ultrastructure in bovine oocytes after inhibition of meiosis by chemical and biological inhibitors. **Mol. Reprod. Dev.**, v.59, p.459-467, 2001.

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

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, 2008.

FISSORE, R.A.; HE, C.L.; VANDE WOUDE, G.F. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. **Biol. of Reprod.**, 55, 1261-1270, 1996.

FORTUNE, J.E.; CUSHMAN, R.A.; WAHL, C.M.; KITO, S. The primordial to primary follicle transition. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.163, p.53-60, 2000.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; EVANS, A.C.O.; TURZILLO, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biol. Reprod.**, v.65, p.648-654, 2001.

FRANCIS, S. H.; CORBIN, J. D. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. **Annu. Rev. Physiol.**, v.56, 237–272, 1994.

FULKA, J.; MOTLIK, J.; FULKA, J.; JILEK, F. Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes. **J. Reprod. Fert.**, v.77, p-281-285, 1986.

GANDOLFI, F.; BREVINI, T.A.L.; CILLO, F.; ANTONINI, S. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v.24, n.1, p.413-423,2005,

GARDNER, D. K., POOL; T. B.; LANE, M. Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, development and viability. **Sem. Reprod. Med.**, v.18, p.205–218, 2000.

GAUTIER, J.; NORBURY, C.; LOHKA, M.; NURSE, P.; MALLER, J. Purified maturation promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. **Cell.**, v.54, p.433-439, 1988.

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.

GILCHRIST, R.B. Interações oócito-células do *cumulus* regulando a qualidade do oócito, **Acta Sci. Vet.**, vol.36, supl.2, p.257-278, 2008.

GILULA, N.B.; EPSTEIN, M.L.; BEERS, W.H. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus–oocyte complex. **J. Cell. Biol.**, v.78, p.58–75, 1978.

GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.H.; SIQUEIRA, A.Q, ANTONIAZZI,A.Q. Biotecnologias da reprodução animal: produção *in vitro* de embriões bovinos. **Ciênc. Vet. Tróp.**, v. 11, supl. 1, p.135-138, 2008.

GOOVAERTS, I.G.F.; LEROY, J.L.M.R.; JORSSSEN, E.P.A.; BOLS, P.E.J. Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture-review. **Theriogenology**, v.74, p.1509–1520, 2010.

GOSDEN, R. G. Oogenesis as a foundation for embryogenesis. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.186, p.149–153, 2002.

GOUGEON, A.; BUSSO, D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.163, p.33-41, 2000.

GRONDAHL, C.; HOST, T.; BRÜCK, I.; VIUFF, D.; BEZARD, J.; FAIR, T.; GREVE, T.; HYTTEL, P. *In vitro* production of equine embryos. **Biol Reprod.**, v.1, p.299-307, 1995.

GULER, A.; POULIN, N.; MERMILLOD, P.; TERQUI, M.; COGNIÉ, Y. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. **Theriogenology**, v.54, p.209-218, 2000.

GUPTA, P.S.P.; RAVINDRA, J.P.; GIRISH KUMAR, V.; RAGHU, H.M.; NANDI, S. Stimulation of *in vitro* ovine oocyte maturation with a novel peptide isolated from follicular fluid of the buffalo (*Bubalus bubalis*). **Small Rumin. Res.**, v.59, p.33-40, 2005.

HAFEZ, E.S.E. REPRODUÇÃO ANIMAL, 6ª edição. São Paulo, Ed. Manole, 1995, 582p.

HAGEMANN, L., BEAUMONT, S., BERG, M., DONNISON, M., LEDGARD, A., PETERSON, A. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. **Mol. Reprod. Dev.**, v.53, p.451–458, 1999.

HAN, D.; LAN, G.; WU, Y.; HAN, Z.; WANG, H.; TAN, J. Factors affecting the efficiency and reversibility of roscovitine (ros) block on the meiotic resumption of goat oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v.73, p.238–246, 2006.

HAN, D.; ZHAO, B.; LIU, Y.; LI, J.; WU, Y.; LAN, G.; TAN, J. Interactive effects of low temperature and roscovitine (ros) on meiotic resumption and developmental potential of goat oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v.75, p.838–846, 2008.

HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; TAKAKURA, R.; IMAI H. bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v.66, p.1696-1701, 2002.

HAZELEGER, N.L.; HILL, D.J.; STUBBING, R.B.; WALTON, J.S. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocyte to their developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, v.43, p.509–522. 1995.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **Int. Rev. Cytol**, v.124, p.43-101, 1991.

HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote**, v.5; p.371–6. 1997.

HUNT, T. Cell cycle arrest and c-mos. **Nature**, v. 355, p.587-588, 1992.

HUNTER, R.H.F.; POLGE, C. Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. **J. Reprod. Fertil.**, v.12, p.525-531, 1966.

HUNTER, A.G.; MOOR, R.M. Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. **J. Dairy Sci.**, v.70, p.1646-1651, 1987.

HYTTEL, P., CALLESEN, H., GREVE, T. Ultrastructural features of preovulator oocyte maturation in superovulated cattle. **J. Reprod. Fertil.**, v.76, p.645-656, 1986.

HYTTEL, P.; GREEVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **J. Reprod. Fertil.**, v. 38, p. 35-47, 1989.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.

ISOBE, N.; MAEDA, T.; TERADA, T. Involvement of meiotic resumption in the disruption of gap junctions between cumulus cells attached to pig oocytes **J. Reprod. Fert.**, v.113, p.167–172, 1998.

JIMENEZ-MACEDO, A.R.; IZQUIERDO, D.; URDANETA, A.; ANGUIA, 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.

JOSEFSBERG, L.B.; GALIANI, D.; LAZAR, S.; KAUFAMAN, O.; SEGER, R.; DEKEL, N. MPF governs MAPK activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. **Biol. Reprod.**, v.68, p.1282-1290, 2003.

KASTROP, P..M.; HULSHOF, S.C.; BEVERS, M.M.; DESTREE, O.H.; KRUIP, T.A. The effects of alpha-amanitin and cycloheximide on nuclear progression, protein synthesis, and phosphorylation during bovine oocyte maturation *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.**, v.28, p.249–254, 1991.

KAWAMURA, K., KUMAGAI, J., SUDO, S., CHUN, S.Y., PISARSKA, M., MORITA, H., TOPPARI, J., FU, P., WADE, J.D., BATHGATE, R.A., HSUEH, A.J., Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.101, p.7323- 7328, 2004.

KENNEY, R.M., CONDON, W., GARJAN, V.K., CHANNING, C.P. Morphological and biochemical correlates of equine ovarian follicles as a function of their stage of viability or atresia. **J. Reprod. Fert.**, v. 2, p.163-171, 1979.

KHATIR ,H.; LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; MERMILLOD, P. Prepubertal bovine oocyte: a negative model for studying oocyte developmental competence. **Mol. Reprod. Dev.**, v.45, p.231–239,1996.

KIDDER, G.M.; MHAWI, A.A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. **Reproduction**, v.123, p.613, 2002.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morulablastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v.54, p.741-766, 2000.

KLINE D. Attributes and dynamics of the endoplasmic reticulum in mammalian eggs. **Curr. Top. Dev. Biol.**, v.50, p.125-154, 2000.

KRISCHEK, C.; MEINECKE, B. Roscovitine, a specific inhibitor of cyclin dependent protein kinases, reversibly inhibits chromatin condensation during *in vitro* maturation of porcine oocytes. **Zygote**, v.9, p.309-316, 2001.

KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **J. Anim. Sci.**, v.82, p. E14–E23,2004.

KOLCH, W. Review: Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. **Biochem. J.**, v.351, p.289-305, 2000.

KRUIP, T.; CRAN, D.; VAN BENEDEN, T.; DIELEMAN, S. Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vitro*. **Gamete Res.**, v.8; p.28-47, 1983.

KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; FULKA, J.J.; PROCHAZKA, R.; RIMKEVIKOVA, Z.; FULKA, J. Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. **Gam. Res.**, v.19, p.423-431, 1988.

LE BEUX, G.; RICHARD, F.J.; SIRARD, M. Effect of cycloheximide, 6-DMAP, roscovitine and butyrolactone I on resumption of meiosis in porcine oocytes. **Theriogenology**, v.60, p.1049–1058, 2003.

LEQUARRE, A.S.; TRAVERSO, J.M.; MARCHANDISE, J.; DONNAY, I. Poly (A) RNA is reduced by half during bovine oocyte maturation but increases when meiotic arrest is maintained with CDK inhibitors. **Biol. Reprod.**, v.71, p.425-431, 2004.

LEVESQUE, J.T.; SIRARD, M. A. Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. **Biol. Reprod.**, v.55, p.1427-1436, 1996.

LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; ROBERTS, T.H.; HIRSHBERG, K. Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v.16, p.557-589, 2000.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine quality and developmental competence following maturation fertilization, and culture in vitro. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 37, p.48-53, 1994.

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.**, v.109, p.355-365, 1997.

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. **Mol. Reprod. Dev.**, v.64, p.369-378, 2003.

MA, S.; LAN, G.; MIAO, Y.; WANG, Z.; CHANG, Z.; LUO, M.; TAN, J. Hypoxanthine, (HX) inhibition of in vitro meiotic resumption in goat oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v.66, p.306-313, 2003.

MARCHAL, R., VIGNERON, C.; PERREAU, C.; BALI-PAPP, A.; MERMILLOD, P. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. **Theriogenology**, v.57, p.1523-1532, 2002.

MARQUES, M. G.; NICACIO, A. C.; OLIVEIRA, V. P.; NASCIMENTO, A. B.; CAETANO, H. V. A.; MENDES, C. M.; MELLO, M. R. B.; MILAZZOTTO, M. P.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D.; VISINTIN, J. A. *In vitro* maturation of pig oocytes with different media, hormone and meiosis inhibitors. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 97, p. 375-381, 2007.

MARTINS, F. S.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.32, n.1, p.36-49, 2008.

MARZZOCO, A., TORRES, B.B., **Bioquímica Básica**, 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MATFEN, W.; DAAR, I.; VANDE WOUDE, G. Protein kinase a acts at multiple points to inhibit xenopus oocyte maturation. **Mol. Cell. Biol.**, p.4419-4426, 1994.

MATZUK, M.M.; BURNS, K.H.; VIVEIROS, M.M.; EPPIG, J.J. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science**, v.296, p.2178-80, 2002.

MÁXIMO, D.M. Características ultraestruturais de ovócitos ovinos durante a maturação in vitro. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 51p. Dissertação de mestrado.

MAYES, M. A.; SIRARD, M. A. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**, v.55, p.911-922, 2001.

MEIJER, L.; BORGNE, A.; MULNER, O.; CHONG, J.P.J.; BLOW, J.J.; INAGAKI, N.; ET AL. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. **Eur. J. Biochem.**, v.243, p.527–536. 1997.

MEINECKE, B.; JANAS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP Kinase Activities in Bovine Oocytes following Protein Synthesis Inhibition. **Reprod. Dom. Anim.** v.36, p.18-188, 2001.

MERMILLOD, P.; OUSSAID, B.; COGNIE, Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl 54, p.449–460, 1999.

MERMILLOD, P.; TAMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24h in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Mol. Reprod. Dev.**, v.55, p.89-95, 2000.

MERMILLOD, P.; DALBIE`S-TRAN, R.; UZBEKOVA, S.; THELIE, A.; TRAVERSO, J. M.; PERREAU, C.; PAPILLIER, P.; MONGET, P. Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle? **Reprod. Dom. Anim.**, v.43, suppl. 2, p.393–400, 2008.

MERTON, J.S.; DE ROOS, A.P.W.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P.L.; DIELEMAN, S.J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v.59, p.651–74, 2003.

MONDADORI, R. G.; GONÇALVES, P. B. D.; NEVES, J. P.; COSTA, L. F. S.; MONTAGNER, M.M.; CARÁMBULA, S. F.; BORTOLOTTI, E. B. Fecundação e clivagem após a ativação da proteína quinase c durante a maturação de oócitos bovinos. **Cienc. Rural**, v.29, n.1, 1999.

MONDADORI, R. G.. Foliculogênese, maturação nuclear e citoplasmática de oócito bubalinos – *Bubalus bubalis*- uma análise estrutural. Brasília: Departamento de Biologia Célula, 2008 120p. Tese de Doutorado.

MOOR, R.M.; OSBORNE, J.C.; CRAN, D.G.; WALTERS, D.E. Selective effect of gonadotropins on cell coupling, nuclear maturation, and protein synthesis in mammalian oocytes. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, v.61, p.347-365, 1981.

MOOR, R.M.; CROSBY, I.M. Protein requirements for germinal vesicle breakdown in ovine oocytes. **J. Embryo Exp. Morph.**, v.94, p.207-220, 1986.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V. Início do desenvolvimento humano. *In*: Moore KL, Persaud TVN. **Embriologia clínica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p.13-38.

MORAES, J.C.F.; SOUZA, D.C.J.H.; JAUME, C.M. Organização e gestão de um programa de controle da reprodução ovina com foco no mercado. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.31, n.2, p.227-233, 2007.

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. **Biol. Reprod.**, v.66, p.1259-1266, 2002.

MORTON, K.M.; DE GRAAF, S.P.; CAMPBELL, A.; TOMKINS, L.M.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Repeated oocyte pick up and *in vitro* embryo production from adult ewes with and without FSH treatment. **Reprod. Domest. Anim.**, v.40, p.422-428, 2005.

MORTON, K.M.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Effect of Aspiration Pressure during Oocyte Harvesting on Oocyte Recovery and *in vitro* Development of Ovine Oocytes. **Reprod. Domest. Anim.**, v.43, p.106-110, 2008.

MOTLAGH, M. K.; SHAHNEH, A. Z.; DALIRI, M.; KOHRAM, H.; GHARAGOZLOU, F. *In vitro* maturation of sheep oocytes in different concentrations of mare serum. **African J. Biotechnol**, v. 7, n.18, p. 3380-3382, 2008.

MOTLIK, J.; FULKA, J.; FLECHON, J.E. Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation *in vivo* and *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.**, v.76, p. 31-37, 1986.

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.

MOTLIK, J.; PAVLOK, A.; LAPATHITIS, G.; KUBELKA, M. Impact of two-step *in vitro* culture systems on developmental potency of oocytes. **Reprod. Domest. Anim.**, v.35, p.267-271, 2000.

NAGANO, M.; KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, Y. Relationship between bovine oocyte morphology and *in vitro* developmental. **Zygote**, v.14, p. 53-61, 2006.

NASHTA, A.A.; WADDINGTON, D.; CAMPBELL, B.K. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development *in vitro*: a comparative evaluation of antral follicle culture with other methods. **Biol. Reprod.**, v.59, p.255-62, 1998.

NEBREDA, A. R.; HUNT, T. The c-mos proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. **The EMBO J.**, vol.12, n.5, p.1979 - 1986, 1993.

NURSE, P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. **Nature**, v.344, p.503-508, 1990.

O'BRIEN, J. K. ; CATT, S. L.; IRELAND, K. A.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. *In vitro* and *in vivo* developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. **Theriogenology**, v.47, p.1433-1443, 1997.

O'BRIEN J.K.; DWARTE, D.; RYAN, J.P.; MAXWELL W.M.; EVANS, G. Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 8, p.1029-1037, 2005.

OH, B.; HAMPL, A.; EPPIG, J.J.; SOLTER, D.; KNOWLES, B. SPIN, a substrate in the MAP kinase pathway in mouse oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 50, p.240-249, 1998.

PALMER, A.; GAVIN, A. C.; NEBREDA, A. R. A link between MAP kinase and p34cdc2/cyclin B during oocyte maturation: p90rsk phosphorylates and inactivates the p34cdc2 inhibitory kinase Myt1. **The EMBO J.**, v.17, n.17, p.5037–5047, 1998.

PENG, X. R. et al. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarina cell types during follicle development and ovulation. **Endocrinology**, v.129, n.6, p.3200-3207, 1991.

PICTON, H.M.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Mol Cell Endocrinol**, v.145, p.27-37, 1998.

PIERSON, R. A. Folliculogenesis and ovulation. *In*: McKinnon AO, Voss JL. (Ed.). Equine reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.161-171.

PINCUS, G.; ENZMANN, E.V. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. **J. Exp. Med.**, v.62, p.665–675, 1935.

POCAR, P.; BREVINI, T.A.; PERAZZOLI, F.; CILLO, F.; MODINA, S.; GANDOLFI, F. Cellular and molecular mechanisms mediating the effects of polychlorinated biphenyls on oocyte developmental competence in cattle. **Mol. Reprod. Dev.**, v.60, p.535–541, 2001.

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. and Dev.**, v.60, p.579-585, 2001.

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.**, v.62, p.513–518, 2002.

RANKIN, T.L.; O'BRIEN, M.; LEE, E.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J.; DEAN, J. Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. **Development**, v.128, p.1119-1126, 2001.

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

RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. **Theriogenology**, v.56, p.1–16, 2001.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro versus in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol. Reprod. Dev.**, v.61, p.234-248, 2002

RODRIGUÉZ-GONZÁLEZ, E.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; VELILLA, E.; PARAMIO, M.T. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. **Theriogenology**, v. 57, n.5, p.1397-1409, 2002.

ROMAR, R.; FUNAHASHI, H. *In vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes after a 48 h culture in roscovitine, an inhibitor of p34cdc2/cyclin B kinase. **Anim. Reprod. Sci.**, v.92, 321–333, 2006.

RÜSSE I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibl. Anat.**, v.24, p.77-92, 1983.

RUSSELL, D.L., SALUSTRI, A. Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. **Sem. in Reprod. Med.**, v.24, p.217–227, 2006.

SADEU, J.C.; CORTVRINDT, R.; RON-EL, R.; KASTERTEIN, E.; SMITZ, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue. **Fert. Ster.**, v.85, n.1, p.1130-1141, 2006.

SAEKI, K.; NAGAO, L Y., KISHI, M.; NAGAI, M. Developmental capacity of bovine oocytes following inhibition of meiotic resumption by cycloheximide or 6-dimethylaminopurine. **Theriogenology**, v. 46, p.1161-l 172, 1997.

SAGATA, N. What does Mos do in oocytes and somatic cells? **Bioessays**, v. 19, n.1, p.13-21, 1997.

SALAMONE, D.F.; DAMIANI, P.; FISSORE, R.A.; ROBL, J.M.; DUBY, R.T. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. **Biol. Reprod.**, v.64,p.1761–1768, 2001.

SCHOEVERS, E.J.; BEVERS, M.M.; ROELEN, B.A.J.; COLENBRANDER, B. Nuclear and cytoplasmic maturation of sow oocytes are not synchronized by specific meiotic inhibition with roscovitine during in vitro maturation. **Theriogenology**, v.63, p.1111-1130. 2005.

SENGER, P.L.; SAACKE, R. G. Unusual mitochondria of the bovine oocyte. **The J. of Cell Biol.**, v.46, p.405-408, 1970.

SHI, L.; YUE, W.; ZHANG J.; LV, L.; REN, Y.; YAN, P. Effect of ovarian cortex cells on nuclear maturation of sheep oocytes during in vitro maturation. **Anim. Reprod. Sci.**, v.113, p.299–304, 2009.

SHIMADA, M.; TERADA, T. FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. **Mol. Hum. Reprod.**, vol.8, n.7, p.612–618, 2002.

SHIOYA, Y.; KUWAYAMA, M.; FUKUSHIMA, M.; IWASAKI, S.; HANADA, A. In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. **Theriogenology**, v.30, n.3, p.489-496, 1988.

SHIRAZI, A.; SHAMS-ESFANDABADI, N.; HOSSEINI, S.M.; KARIMI, I. The presence of cumulus cells on nuclear maturation of sheep oocytes during in vitro maturation. **Small Ruminant Res.**, v.68, p.291–295, 2007.

SHIRAZI, A.; SADEGHI, N. The effect of ovine oocyte diameter on nuclear maturation. **Small Ruminant Res.**, v. 69, p. 103–107, 2007.

SHOUBRIDGE, E., WAI, T. Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte. **Curr. Top. Dev. Biol.**, v. 77, p.87-111, 2007.

SILVA, I. O. Inibição e reversão da maturação nuclear, avaliação da maturação citoplasmática e produção de esteróides em complexos cumulus oophorus bovinos cocultivados com hemiseções foliculares em meio de cultura definido. 2008. 84 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

SIMON, M.; JÍLEK, F.; FULKA JR, J. Effect of cycloheximide upon maturation of bovine oocytes **Reprod. Nutr. Dev.**, v.29, p.533-540, 1989.

SIMPLÍCIO, A.A.; FREITAS, V.J.F.; FONSECA, J.F. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.31, n.2, p.234-246, 2007.

SINGH, B.; ARLINGHAUS, R.B. Mos and the cell cycle. **Prog. Cell. Cycle Res.**, v. 3, p. 251-259, 1997.

SINGH, R.; SINCLAIR, K.D. Metabolomics: Approaches to assessing oocyte and embryo quality. **Theriogenology**, v.68, suppl 1, p.56S–62S, 2007.

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

SIRARD, M.A.; FLORMAN, H.M.; LEIBFRIED-GUTLEDGE, M.L.; BARNES, F.L.; SIMS, M.L.; FIRST, N.L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biol. Reprod.**, v. 40, p.1257-1263, 1989

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

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

SOOM, A. V.; TANGHE, S. PAUW, I. D.; MAES, D.; KRUIF, A. Function of the Cumulus Oophorus Before and During Mammalian Fertilization. **Reprod. Dom. Anim.**, v.37, p.144–151, 2002.

STAIGMILLER, R.B. *In vitro* methods for production of viable oocytes. **J. Anim. Sci.**, v.66, p.55-64, 1988.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; STOJKOVIC, 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. **Biol Reprod**, v.64, p.904-909, 2001.

STRICKER, S.A. Structural reorganization of the endoplasmic reticulum during egg maturation and fertilization. **Sem. Cell. Dev. Biol.**, v.17, p.303-313, 2006.

SU, Y.Q.; DENEGRE, J. M.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F. L.; O'BRIEN, M. J.; EPPIG, J. J. Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte–cumulus cell complex. **Dev. Biol.**, v.263, p.126–138, 2003.

SUN, Q.Y.; WU, G.M.; LAI, L.X.; BONK, A.; CABOT, R.; PARK, K.W.; DAY, B.N.; PRATHER, R.S.; SCHATTEN, H. 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.**, v.66, p.580–588, 2002.

TAKAYAMA, O.; DOCHI, O.; KOYAMA, H. Effect of meiotic arrest by cicloheximide on the *in vitro* maturation of bovine oocytes and their subsequent development following *in vitro* fertilization. **J. Mamm. Ova Rese.**, v. 23, p.67-71, 2006

THIBAULT, C.; SZÖLLÖSI, D.; GÉRARD, M. Mammalian oocyte maturation. **Reprod. Nutr. Dévelop.**, v.27, n.5, p.865-896, 1987.

TAMASSIA, M.; HEYMAN, Y.; LAVERGNE, Y.; RICHARD, C.; GELIN, V.; RENARD, J.P.; CHASTANT-MAILLARD, S. Evidence of oocyte donor cow effect over oocyte production and embryo development *in vitro*. **Reproduction**, v.126, p.629–637, 2003.

TANGHE, S.; SOOM, A.V.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M. DE KRUIF, A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization. **Mol. Reprod. Dev.**, v.61, p.414 – 424, 2002.

TATEMOTO, H.; HORIUCHI, T.; TERADA, T. Effects of cycloheximide on chromatin condensations and germinal vesicle breakdown (GVBD) of cumulus-enclosed and denuded oocytes in cattle. **Theriogenology**, v.42, p.1141-1148, 1994.

TATEMOTO, H. TERADA, T. Time-dependent effects of cycloheximide and α -amanitin on meiotic resumption and progression in bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, v. 43, p.1107- 1113, 1995.

TATEMOTO, H.; SAKURAI, N.; MUTO, N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of cumulus cells. **Biol. Reprod.**, v.63, p.805–810, 2000.

TOMEK, W.; TORNER, H.; KANITZ, W. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes *in vitro*. **Reprod. Dom. Anim.**, v.37, p.86–91, 2002.

TOSTI, E. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v.4, p.26, 2006.

TRALDI, A.S. Biotécnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes. In: CONGRESSO INTERNACIONAL FEINCO, 3., 2008, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 2008, p.1-11.

TSAFRIRI, A.; CHUN, S.; ZHANG, R.; HSUEH, A. J. W.; CONTI, M. Oocyte Maturation Involves Compartmentalization and Opposing Changes of cAMP Levels in Follicular Somatic and Germ Cells: Studies Using Selective Phosphodiesterase Inhibitors. **Dev. Biol.**, v.178, p. 393–402, 1996.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; BECKERS, J.F. *In vivo* and *in-vitro* development of preantral follicles. **Theriogenology**, v.47, p.73-82, 1997.

VERDE, F.; DOGTEROM, M.; STELZER, E.; KARSENTI, E.; LEIBLER, S. Control of microtubule dynamics and length by cyclin A- dependent and cyclin B – dependent kinase in *Xenopus* egg extracts. **The J.Cell. Biol.**, v.118, p.1079-1108, 1992.

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.**, v.65, p.114-121, 2003.

VIGNERON, C.; PERREAU, C.; DALBIES-TRAN, R.; JOLY, C.; HUMBLLOT, P.; UZBEKOVA S, *et al.* Protein synthesis and mRNA storage in cattle oocytes maintained under meiotic block by roscovitine inhibition of MPF activity. **Mol. Reprod. Dev.**, v.69, p.457–465, 2004.

VORONINA, E.; WESSEL, G. M. The Regulation of Oocyte Maturation. **Cur. Top. in Dev. Biol.**,v.58, p.53-110, 2003.

ZHANG, L., JIANG, S., WOZNIAK, P.J., YANG, X., GODKE, R.A. *Cumulus* cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. **Mol. Reprod. Dev.**, v.40, p.338–344,1995.

WANG, Q.; SUN, Q.Y. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.19,p.1–12, 2007.

WASSARMAN, P.M. The mammalian ovum. In Knobil,,E. & Neill, J. **The Physiol. of Reprod.** Raven Press, New York, 1988, p.69-101.

WEHREND, A.; MEINECKE, B. Kinetics of progression, M-phase promoting factor (MPFP and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. **Anim. Reprod. Sci.**, v.66, p.175-184, 2001.

WU, G.M.; SUN, Q.Y.; MAO, J.; LAI, L.; MCCAULEY, T.C.; 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. **Biol. Reprod.**, v.67, p.170–177, 2002.

WU, C.; RUI, R.; DAI, J.; ZHANG, C.; JU, S.; XIE, B.; LU, X.; ZHENG, X. Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 73, p. 1454- 146, 2006.

YE, J.; FLINT, A.P.F.; CAMPBELL; K.H.S.; LUCK, M.R. Synchronization of porcine oocyte meiosis using cycloheximide and its application to the study of regulation by cumulus cells. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.14, pa.422-442, 2002.

YE, J.; CAMPBELL, K.H.S.; CRAIGON, J.; LUCK, M.R. Dynamic changes in meiotic progression and improvement of developmental competence of pig oocytes *in vitro* by follicle-stimulating hormone and cycloheximide. **Biol. Reprod.**, v.72, p.399-406, 2005.

ANEXO I

TCM 199 com HEPES: M7528 – Sigma-Aldrich®

TCM 199 com sais de Earl: 11150-059, GIBCO®

FSH: Folltropin®-V, BIONICHE®

LH: Lutropin-V, BIONICHE®

Penicilina/estreptomicina (penicilina/estreptomicina): 15140-122, GIBCO®

Piruvato de sódio (Pyruvic Acid): P2256, Sigma-Aldrich®

Cisteamina (Cysteamine): 30070 Sigma-Aldrich®

Soro Fetal Bovino (Fetal Bovine Serum): 14040 GIBCO®

Heparina (Heparin Sodium Salt): H3149 - Sigma-Aldrich®

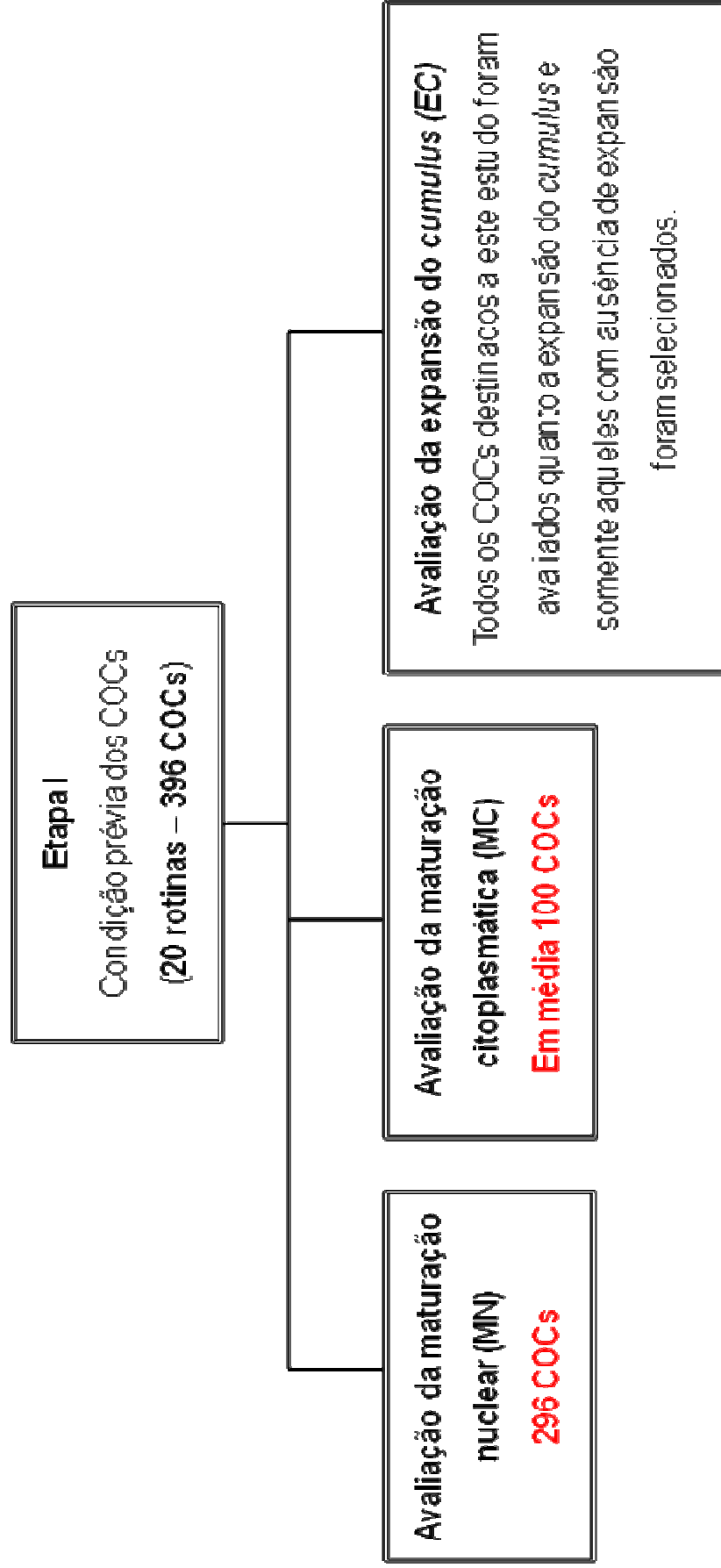
Hoescht 33342 (bisbenzimidazóla): H1399, INVITROGEN®

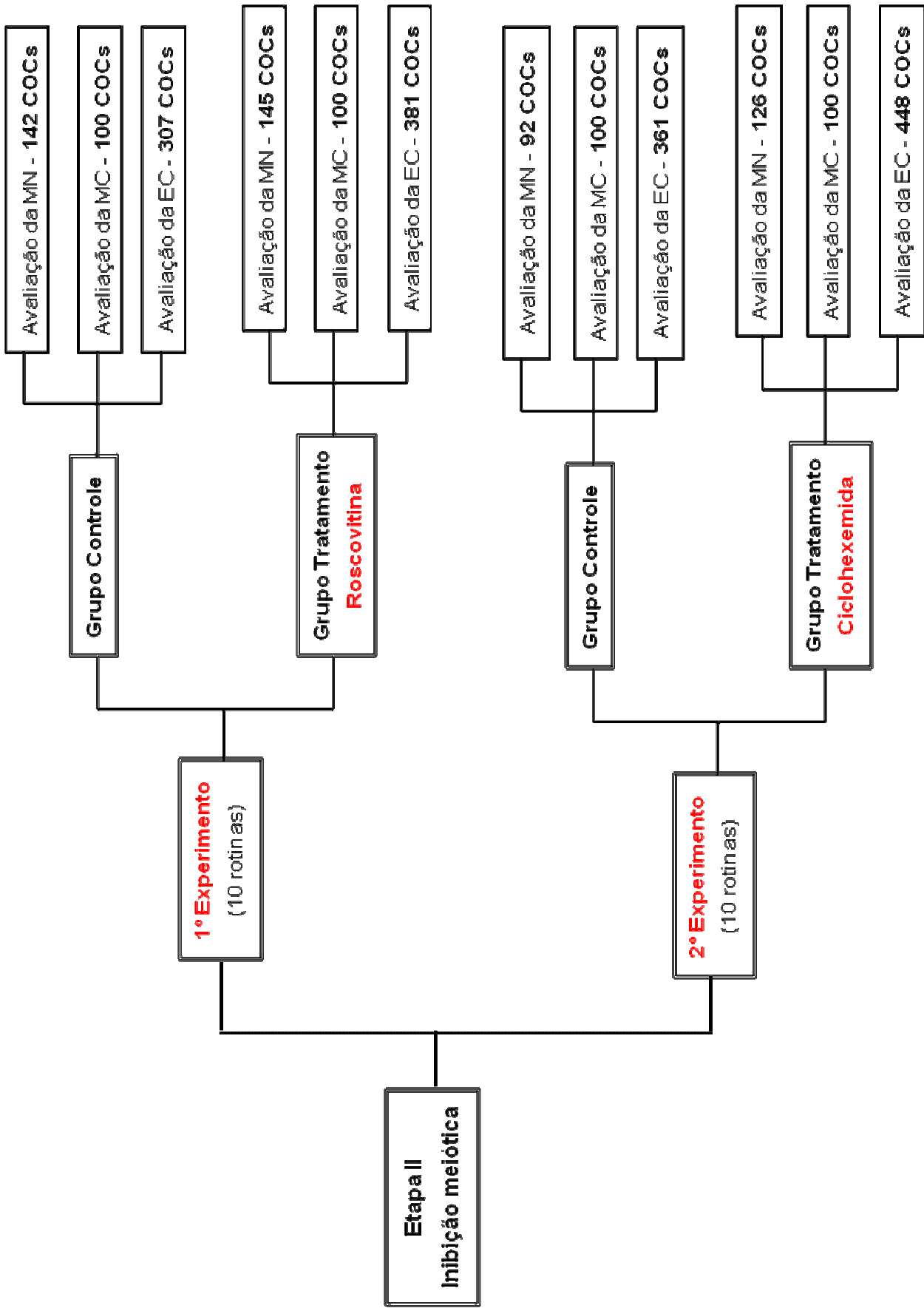
Dimetilsulfóxido (dimethylsulfoxide): D2650-5X5ML

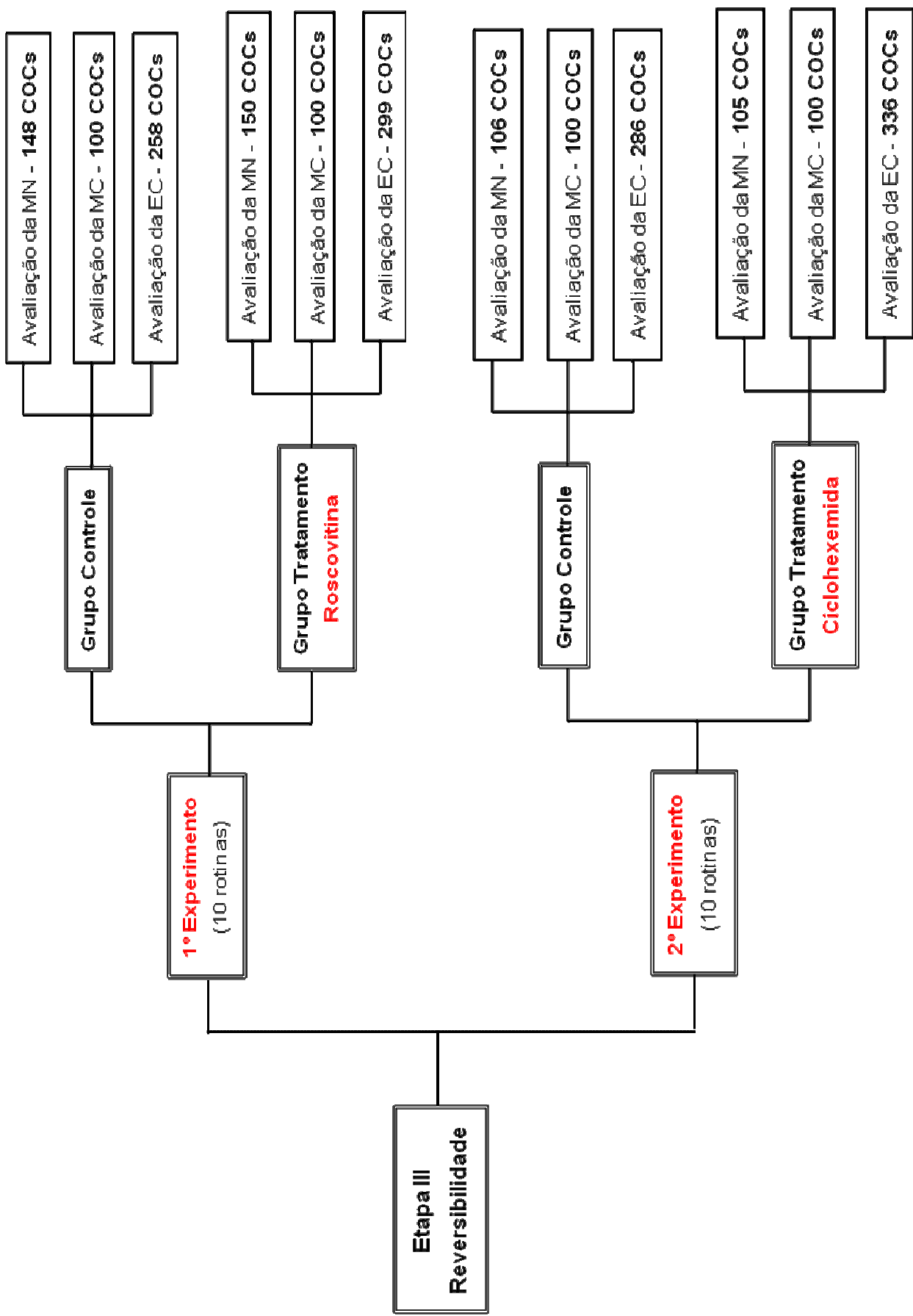
Roscovitina (roscovitine) R7772 – Sigma -Aldrich®

Ciclohexemida (cycloheximide) – C1988 – Sigma- Aldrich®

ANEXO II – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA (ETAPAS I, II, III) DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL







TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA

MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT

Cytoplasmic maturation progression and ultrastructure changes in ovines COCs *in vitro* cultured with roscovitine or cycloheximide.

Letícia Ferrari Crocomo, Wolff Camargo Marques Filho, Mateus José Sudano,
Daniela Martins Paschoal, Fernanda da Cruz Landim Alvarenga, Sony Dimas
Bicudo

Cytoplasmic maturation progression and ultrastructure changes in ovines COCs *in vitro* cultured with roscovitine or cycloheximide.

Letícia Ferrari Crocomo^{1*}, Wolff Camargo Marques Filho¹, Mateus José Sudano¹, Daniela Martins Paschoal¹, Fernanda da Cruz Landim Alvarenga¹, Sony Dimas Bicudo^{1*}

¹Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology - School of Veterinary Medicine and Animal Science - São Paulo State University - UNESP, Distrito de Rubião Junior s/n^o, 18603-970, Botucatu/SP-Brazil.

***Corresponding Author:**

Sony Dimas Bicudo

Letícia Ferrari Crocomo

e-mail address: lfcrocomo@hotmail.com; sony@fmvz.unesp.br

Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology - School of Veterinary Medicine and Animal Science - São Paulo State University - UNESP, Distrito de Rubião Junior s/n^o, 18603-970, Botucatu/SP-Brazil.

Phone/Fax: 55 14 38116249

Abstract

It is believed that the temporary meiosis arrest may improve the developmental competence oocyte. Roscovitine and cycloheximide have been shown to reversibly inhibit meiotic resumption in different animal species. However, controversies still exist regarding to the subsequent embryo developmental potential and little is known about the effects of these inhibitors on ultrastructure of ovine *cumulus* oocyte complexes (COCs). The aim of this research was to evaluate the cytoplasmic maturation progression and the ultrastructure changes in ovine COCs exposed to roscovitine or cycloheximide, at acceptable concentrations. To this, ovine COCs were *in vitro* cultured for 24 hours in maturation medium (control group) containing 100µM roscovitine or 1µg/ml cycloheximide (treatments groups). After this period, they were either processed for assessment of cytoplasmic maturation, in transmission electron microscopy (TEM), or *in vitro* culture for further 22 hours in inhibitors-free medium and

subsequently processed for TEM. While COCs treated with roscovitine displayed *cumulus* cells degeneration, swelling of mitochondrias, reduction in the cortical granules population and increase of electron-dense material in their vesicles, the *in vitro* culture with cycloheximide did not promote these changes, and COCs did not show degeneration signs and evidences of cellular senescence. In all experimental groups, were found metabolic units and mitochondrial pleomorphism being that the most of them had an arc-like projection. Our results indicate that roscovitine promoted irreversible ultrastructural changes while cycloheximide did not affect the cytoplasmic maturation. However, the implications of this on embryo development are still unclear and more studies are needed.

Key-words: ovine, meiosis inhibitors, ultrastructural changes, development oocyte

1. INTRODUCTION

Although the rate of embryos that reach the blastocyst stage is an important parameter for evaluating the *in vitro* embryo production (IVP) efficiency, the success of this biotechnology depends mainly on the oocyte quality, which is directly related to nuclear and cytoplasmic maturation, and determines the development potencial of oocytes and embryos (Rizos et al., 2002). Also according to Ferreira et al. (2008), only the correct dynamic of chromosome segregation, during nuclear maturation, does not confer oocyte competence to support the development. It is also important to have adequate cytoplasmic maturation, characterized by the cytoplasmic organelles redistribution and synthesis and storage of proteins, mRNA and other factors. In this oocyte maturation process, the *cumulus* cells play an important role: by keeping the meiotic arrest; by participating in the induction of meiotic resumption; and by supporting cytoplasmic maturation, through to their gap junctional network and to their specific metabolizing capacities (Tanghe et al., 2002).

While *in vivo*, meiosis is resumed by the preovulatory surge of LH (Hyttel et al., 1997), *in vitro*, the oocytes spontaneously resume meiosis, when they are removed from the follicular environment (Pincus & Enzmann, 1935), resulting in asynchrony between nuclear and cytoplasmic maturation and consequently

lower rates of embryo development (Blondin et al., 1997). In order to confer time and adequate conditions for cytoplasmic maturation progression and consequently to improve the quality of *in vitro* matured oocytes, several authors have been proposed the temporary meiosis arrest of oocyte with pharmacological or physiological inhibitors (Le Beux et al., 2003).

In this context, roscovitine, a specific inhibitor of cyclin-dependent kinases and cycloheximide, an inhibitor of protein synthesis have been extensively studied in different animal species (bovine: Albarracín et al., 2005; Takayama et al., 2006; pig: Fulka et al. 1986; Coy et al., 2005; goat: Han et al., 2006). While Meinecke et al. (2001) reported that the meiotic arrest promoted by cycloheximide in bovine COCs was effective and reversible, Lonergan et al. (1997) observed lower potential to develop into blastocysts, despite of the meiotic inhibition reversibility and the adequate cleavage rates. However, Saeki et al. (1997) obtained calves from oocytes treated with cycloheximide. This discrepancy between authors regarding to subsequent embryo developmental potential was also observed in COCs treated with roscovitine, despite of the reports of efficiency and reversibility of meiotic arrest promoted by this inhibitor in different animal species (bovines: Albarracín et al., 2005; goats: Han et al., 2006; pigs: Coy et al., 2005).

Lonergan et al. (2003) described some morphological changes in bovine COCs after exposure to 125 μ M roscovitine, for 24 hours, as: disruption of the integrity of the surrounding cumulus cells, swelling of mitochondrial cristae, degeneration of cortical granules and convolution of the nuclear membrane. Albarracín et al. (2005) also recorded increases in the percentage of abnormal spindles and actin distribution in bovine oocytes treated with 100 μ M roscovitine, which were reversible after removal of this inhibitor. The same way, Ju et al. (2003) observed that roscovitine promoted chromatin and cytoskeleton alterations reversible in pig oocytes. Reports about the effect of cycloheximide on the oocyte ultrastructure were not found.

However, relatively little is known about the effects of these inhibitors on nuclear maturation and ultrastructure of ovine COCs. Then, the aim of this research was to evaluate the cytoplasmic maturation progression, in relation to the organelles distribution and *cumulus* cells characteristics, and the ultrastructure changes in ovine COCs exposed, for 24 hours, to either

roscovitine or cycloheximide, followed by *in vitro* culture for additional 22 hours in inhibitor free medium. The inhibitors concentrations, in this study, were determined according to results of ours previous tests and of others researches (Fulka et al., 1986; Albarracín et al, 2005; Han et al, 2006).

2. Materials and Methods

This research was conducted at the Laboratory of Reproduction and Advanced Cell Teraphy of School of Veterinary Medicine and Animal Science – São Paulo University University (UNESP) in Botucatu, São Paulo, Brazil. Unless otherwise indicated, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

2.1. Oocyte recovery and prematuration whit meiosis inhibitors

Ovine ovaries were collected at slaughter and transported to the laboratory in sterile saline solution (0.9% NaCl) at 35°C. All visible follicles were aspirated using a 20-gauge needle attached to a 10ml syringe. Only COCs with homogeneous ooplasm and surrounded by at least two layers of compact *cumulus* cells were selected for this study. After washes in HEPES buffered TCM 199, groups of approximately 20-25 COCs were placed in 90ul drops of maturation medium (control group) containing 100µM roscovitine or 1µg/ml cycloheximide (treatment groups), under mineral oil, and was cultured for 24 hours at 38.5°C in a 5% CO₂ saturated humidity air atmosphere. The maturation medium was comprised of TCM199 with Earle's salts supplemented with 0,1 UI/ml FSH, 0,1 UI/ml LH, 0,3 mM sodium pyruvate, 75 µg/ml penicillin, 10% fetal calf serum (FCS) and 100 µM cysteamine. Stock Solutions of 1g/l roscovitine and 20mg/l cyclohexemide were prepared in dimethylsulphoxide (DMSO) and in TCM 199, respectively, aliquoted and stored at -20°C until use.

2.2- Reversion of meiotic inhibition

To allow the arrested oocytes to resume meiotic maturation, COCs were rinsed several times in TCM 199 HEPES and then cultured in maturation medium for a further 22 hours at 38.5°C in a 5% CO₂ saturated humidity air atmosphere, totaling 46 hours of *in vitro* culture. In the control group, COCs

were cultured for 24 hours followed by another 22 hours in maturation medium without meiosis inhibitors.

2.3 – Processing for COCs ultrastructural analysis in TEM

The ultrastructural analysis of COCs was performed by electron microscopy center of the Biosciences institute of UNESP-Botucatu. COCs were fixed in 2,5% glutaraldehyde in 0,1M PBS (pH 7,4) for 24 hours, and were post fixed in osmium tetroxide. After dehydration in ascending concentrations of acetone (70%, 90% e 100%), COCs were embedded in blocks of Epon resin and were kept for 3-4 days in an incubator at 60 °C for polymerization. The blocks of Epon were serially semithin-sectioned (1- 2 µm) and the semi-thin sections were stained with toluidine blue and evaluated under light microscope. After evaluation of this material, the selected semi-thin sections were ultra-thin sectioned with diamond blade, mounted on cooper grids and contrasted with uranyl acetate and lead citrate for analysis in a transmission electron microscope Philips CM 100. The *cumulus* oocytes complexes were evaluated according the distribution pattern of organelles and characteristics of the cumulus cells as described by Hyttel et al. (1989, 1986, 1997).

2.4. Experimental Design

For this study, ovine COCs were randomly divided into seven groups. Each experimental group consisted of approximately 100 COCs. The seven groups were:

- (1) **Immature**: Immediately after harvest and washing in HEPES buffered TCM 199, COCs were fixed for transmission electron microscopy;
- (2) **Control (24 hours)**: COCs were fixed after 24 hours of IVM in inhibitor-free medium;
- (3) **Roscovitine treatment**: COCs were fixed after 24 hours of *in vitro* culture with 100µM roscovitine;
- (4) **Cycloheximide treatment**: COCs were fixed after 24 hours of *in vitro* culture with 1µg/ml cycloheximide;
- (5) **Control (46hours)**: COCs were fixed after 46 hours of *in vitro* culture in inhibitor-free medium;

- (6) **Reversibility of roscovitine treatment:** COCs treated with roscovitine were fixed after *in vitro* culture for additional 22 hours in inhibitor-free medium;
- (7) **Reversibility of cycloheximide treatment:** COCs treated with cycloheximide were fixed after *in vitro* culture for additional 22 hours in inhibitor-free medium.

2. RESULTS

Group (1): Immature COCs

COCs fixed immediately after harvest showed immaturity signs characterized by the presence of several layers of nonexpanded *cumulus* cells (Fig.1A); presence of cytoplasmic projections emitted by *cumulus* cells which cross the zona pellucid and form communications with the oocyte through of gap junctions (Fig.1B); previtelline space undeveloped; and plasma membrane with a few and small microvilli (Fig.1A). Clusters of pleomorphic mitochondrias were located mainly at the periphery of the oocytes (Fig.1C), with a small number evenly distributed by throughout the ooplasm. They had few parallel ridges and were generally round, elongated and some had an arc-like projection (Fig.1C), as the sample cutting. A large number of smooth endoplasmic reticulum (SER) and lipid droplets were detected in association with mitochondiras, constituting the metabolic or functional units (Fig.1 C) described by Kruip et al. (1983). Large amount of SER and lipid droplets were also found disperses throughout the ooplasm. Well developed Golgi complexes (Fig.1C) consisting of several layers of flattened sacs, associated with many and small vesicles, were located mainly in the periphery of the oocyte. Few clusters of cortical granules (Fig.1C), spherical and heterogeneous in size and coloration were detected disperses throughout the ooplasm and in association with Golgi complexes. Few electron-lucent vesicles, some myelin figures were also found.

Group (2): Control (24 hours)

COCs fixed after 24 hours of IVM in inhibitor-free medium showed maturity signs characterized by full expansion *cumulus* cells with substancial loss of cells (Fig.2A); retraction of cytoplasmic projections emitted by *cumulus* cells (Fig.2A), some of them visible within the perivitelline space and disjunction of junctional

complexes (Fig.2B). The perivitelline space was more developed and oocyte plasma membrane had several microvilli (Fig. 2B). Large amount of pleomorphic mitochondrias (Fig.2C) with the same aspect from those of immature COCs was disperse by throughout the ooplasm. In this group was also detected fewer lipid granules (Fig.2C) and larger quantity of electron-lucent and myelin figures (Fig.2C) evenly distributed throughout the ooplasm. SER was associated with mitochondrias and lipid granules and were disperses in the ooplasm. There was substancial reduction of Golgi complexes in terms of quantity and size, and large amount of cortical granules with the same aspect from those of immature COCs but with more homogeneous electrodense were isolated and aligned with the oocyte plasma membrane (Fig.2B).

Group (3): Roscovitine treatment

COCs treated with roscovitine showed some characteristics of maturity and immaturity as: partial cumulus expansion (Fig.3A); retraction of cytoplasmic projections emitted by cumulus cells, some of them visible within the perivitelline space, and substancial reduction of junctional complexes (Fig.3B). Perivetelline space was well developed and oocyte plasma membrane had fewer microvilli (Fig.3B) than the COCs of control group (2). Large amount of pleomorphic mitochondrias rounded, elongated or with an arc-like projection was evenly distributed throughout the ooplasm (Fig.3C), as well as in the COCs of control group (2). However, the mitochondrias appeared to be less electron-dense and swollen, and some of them displayed mitochondrial granules (Fig.3C). There were many lipid granules (Fig.3C) and few electron-lucent vesicles disperse throughout the ooplasm as observed in immature COCs. However, electron-lucent vesicles contained varying amounts of electron-dense material (Fig.3C). Large amount of myelin figures and SER associated with mitochondrias and disperses in the ooplasm were also found. Golgi complexes were not found and there were few cortical granules with homogeneous electrodense isolated and aligned with the oocyte plasma membrane (Fig.3B). In this group, degeneration signs were identified in *cumulus* cells, which had pyknotic nuclei (Fig.3A). However, the ooplasm and the organelles did not show degeneration signs.

Group (4): Cycloheximide treatment

COCs treated with cycloheximide showed the same characteristics of maturity observed in the COCs of Control group (2), which were *in vitro* culture for 24 hours in inhibitor-free medium, as noted at figure 2 (A;B;C).

Group (5): Control (46hours)

COCs fixed after 46 hours of *in vitro* culture in inhibitor-free medium revealed characteristics of maturity similar to those observed in the COCs of control group (2), as noted at figure 2 (A;B;C). However, besides the full *cumulus* expansion, there were also dispersion and substantial loss of cells (Fig.4A). Moreover, few myelin figures were found disperses in the ooplasm and well developed endoplasmic reticulum was concentrated in some areas of the ooplasm and in association with mitochondria and lipid granules.

However, COCs of this group also showed evidences of cellular senescence characterized by degeneration signs in the ooplasm, as several areas of cytoplasmic matrix absence (Fig.4B). Degeneration signs of was also observed in cumulus cells, which had pyknotic nuclei.

Group (6): Reversibility of roscovitine treatment

COCs treated with roscovitine and then *in vitro* culture for more 22 hours in inhibitor-free medium revealed characteristics of maturity and immaturity similar to those observed in the COCs treated with roscovitine (group 3), as noted at figure 3 (A;B;C). However, there was also full *cumulus* expansion, dispersion and substantial loss of *cumulus* cells (Fig.4A). Furthermore, *cumulus* cells showed degeneration signs, as pyknotic nuclei. As observed in the control group (6), evidences of cellular senescence were also detected in the oocytes (Fig.4B).

Group (7): Reversibility of cycloheximide treatment

COCs treated with cycloheximide and then *in vitro* culture for more 22 hours in inhibitor-free medium revealed characteristics of maturity similar to those observed in the COCs of control group (2), as noted at figure 2 (A;B;C). In contrast to the COCs of group (6), there wasn't substantial loss of *cumulus* cells (Fig.5A) and also no degenerations signs were found in the oocyte or in

the *cumulus* cells. However, despite of maturity evidences, large amount of lipid granules evenly distributed throughout the ooplasm (Fig.5B) was also observed.

4. DISCUSSION

The findings of this present study demonstrate that the immaturity and maturity signs are consistent with those expected for COCs analyzed before (group1) and after (group 2) the *in vitro* culture for 24 hours in maturation medium free of inhibitors, respectively, and indicate that the *in vitro* culture conditions were adequate and allowed the oocyte maturation progression, in terms of organelles distribution and *cumulus* expansion. These results also agree with reports on literature for others mammalian species (bovine: Nagano et al., 2006; ovine: O'Brien et al., 2005; equine: Alvarenga, 2006; pig: Cran,1985). The evidences of cellular senescence after *in vitro* culture for 46 hours in the absence of meiosis inhibitors, also are consistent with the expected, since the adequate time for IVM of ovines COCs varies from 24 hours (Shi et al., 2009) at 26-27 hours (Shirazi & Sadeghi, 2007).

According to Isobe et al. (1998), meiotic resumption is directly related to the disruption of gap junctions between the *cumulus* cells and the oocyte, due to *cumulus* expansion. Thus, it is believe that the partial *cumulus* expansion and presence of some junctional complexes observed in the COCs treated with roscovitine, are directly related to the efficiency of meiotic arrest promoted by this inhibitor, since there is prolonged contact between the oocyte and *cumulus* cells, which are involved in the oocyte maturation regulation. However, the treatment, for 24 hours, with 100uM roscovitine also resulted in *cumulus* cells degeneration, besides of substancial loss of cells after *in vitro* culture for additional 22 hours in inhibitor-free medium. Similary, Lonergan et al. (2003) reported absence of *cumulus* expansion, premature loss and degeneration of *cumulus* cells even after *in vitro* culture in absence of this inhibitor.

In contrast, treatment with 1ug/mL cycloheximide did not interfere in *cumulus* cells, which were fully expanded and without degeneration signs at the end of *in vitro* culture for 24 and 46hours. However, as in control group (2), there was disjunction of junctional complexes. Differently, Saeki et al. (1997) reported expansion absence, degeneration and disaggregation of *cumulus* cells of bovine COCs after *in vitro* culture for 48 hours whit 10ug/mL cicloheximide.

This divergence of results involves many factors as: the action mode and concentration of inhibitors; the *in vitro* culture time of COCs with inhibitors and the animal species under study. It is noteworthy that remains unclear whether the observed effect of these inhibitors on *cumulus* cell expansion occurs via the oocyte or directly via the *cumulus* cells (Schoevers et al., 2005).

According to Stojkovic et al. (2001) mitochondrias are responsible for the supply of energy that will be consumed during the maturation oocyte and embryo development. The movement of mitochondrias to areas with higher energy consumption as well as the amount increase of these organelles along the oocyte maturation are crucial for oocyte and embryo development (Shoubridg et al., 2007). According Hyttel et al. (1986), during the oocyte maturation, mitochondrias move from a more peripheral position to a more disperse distribution throughout the ooplasm as well as observed in this study in immature (group 1) and mature COCs (group2).

Our results further demonstrate that the distribution and amount of mitochondrias after treatment with roscovitine or cycloheximide were similar to that observed in COCs *in vitro* culture for 24 hours in maturation medium free of inhibitors. However, roscovitine treatment affected the electron density of mitochondrias and appeared to cause swelling of them as well as reported by Lonergan et al. (2003). While in cycloheximide treatment, no alteration was observed. These findings suggest that ovine oocyte mitochondrias were significantly affected by culture with 100 uM roscovitine.

As reported by Máximo et al. (2009) and Senger & Saacke (1970), in ovine and bovine oocytes, respectively, in all experimental groups of this study was found mitochondrial pleomorphism and the most of mitochondrias had an arc-like projection, which gives higher mitochondrial surface and is probably related to high metabolism throughout of the oocyte maturation.

In all experimental groups, mitochondrias were associated with endoplasmic reticulum and lipid droplets, forming the metabolic units (Kruip et al., 1983) which are related to the lipid reserve metabolization and lipoprotein synthesis and are especially required in the early oocyte maturation. Therefore, during the oocyte development is expected to occur amount reduction of lipid granules and amount increased of myelin figures, which are structures related to lipid metabolization (Wu et al., 2006). However, COCs treated with

cycloheximide showed large amount of lipid granules after *in vitro* culture for 22 hours in the inhibitor absence, which probably corresponds to an individual characteristic of examined oocytes, since in this study, ovaries were randomly collected at the slaughterhouse, regardless of physiological female conditions.

As expected, well developed Golgi complexes were found only in immature COCs, and after *in vitro* maturation for 24 hours, cortical granules were isolated and aligned with the oocyte plasma membrane, forming a monolayer strategically to prevent polyspermy (Carneiro et al., 2002). In comparison with others experimental groups, COCs treated with roscovitine also displayed reduction in the cortical granules population and increase of electron-dense material in their vesicles, after *in vitro* culture for 24 and 46 hours. In contrast, COCs treated with cycloheximide did not show degeneration signs and evidences of cellular senescence even after *in vitro* culture for additional 22 hours without inhibitors, as observed in others experimental groups.

Therefore, our results demonstrate that the treatment with 1 µg/mL cycloheximide did not impair cytoplasmic maturation of ovine COCs which showed maturity signs without ultrastructure changes, at the end of *in vitro* culture for 24 and 46 hours. In contrast, the treatment with 100 µM roscovitine resulted in harmful and irreversible changes in oocytes and in *cumulus* cells, which prevented the cytoplasmic maturation progression. These differences of results can be attributed to different action mechanisms and different concentrations of these inhibitors (Faerge et al., 2001).

In conclusion, while it has been shown that inhibition of meiotic resumption with roscovitine or cycloheximide is possible, fully reversible and that oocytes treated are capable of undergoing maturation and fertilization, there are yet controversies regarding the subsequent embryo and fetal developmental potential. Our study showed that roscovitine promoted irreversible ultrastructural changes in ovine COCs while cycloheximide did not affect the cytoplasmic maturation. However, the implications of these observations in subsequent embryo development are still unclear and more studies are needed to verify the effects of these meiosis inhibitors on biochemical and molecular events that are occurring during oocyte maturation.

Acknowledgements

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil.

5- REFERENCES

Albarracin JL, Morato 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.

Alvarenga FCL. 2006. Structural aspects of equine oocytes matured in vivo and in vitro. *Braz J Vet Res Anim Sci* 23:513-524.

Blondin P, Coenen K, Guilbault LA, Sirard MA. 1997. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology* 47:1061-1075.

Carneiro GF, Liu IK.M, Hyde D, Anderson GB, Lorenzo PL, Balli BA. 2002. Quantification and distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation. *Mol Reprod Dev* 63:451–458.

Coy P, Romar R, Ruiz S, Cánovas S, Gadea J, Vázquez G F, Matás C. 2005. Birth of piglets after transferring of in vitro-produced embryos pre-matured with R-roscovitine. *Reprod* 129:747–755.

Cran D G. 1985. Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. *J Reprod Fert* 74:237-245.

Faerge I, Mayes M, Hyttel P, Sirard MA. 2001. Nuclear ultrastructure in bovine oocytes after inhibition of meiosis by chemical and biological inhibitors. *Mol Reprod Dev* 59:459-467.

Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS. 2008. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 71:836-848.

Fulka J, Motlik J, Fulka J, Jilek F. 1986. Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes. *J Reprod Fert* 77:281-285.

Han D, Lan G, Wu Y, Han Z, Wang H, Tan J. 2006. Factors affecting the efficiency and reversibility of roscovitine (ros) block on the meiotic resumption of goat oocytes. *Mol Reprod Dev* 73:238–246.

Hyttel P, Callesen H, Greve T. 1986. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *J Reprod Fert* 76:645-656.

Hyttel P, Greeve T, Callesen H. 1989. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J Reprod Fert* 38: 35-47.

Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47:23-32.

Isobe N, Maeda T, Terada T. 1998. Involvement of meiotic resumption in the disruption of gap junctions between cumulus cells attached to pig oocytes. *J Reprod Fertil* 113:167-172.

Ju JC, Tsay C, Ruan CW. 2003. Alterations and reversibility in the chromatin, cytoskeleton and development of pig oocytes treated with roscovitine. *Mol Reprod Dev* 64:482-491.

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

Le Beux G, Richard FJ, Sirard M. 2003. Effect of cycloheximide, 6-DMAP, roscovitine and butyrolactone I on resumption of meiosis in porcine oocytes. *Theriogenology* 60:1049-1058.

Lonergan P, Khatir H, Carolan C, Mermillod P. 1997. Bovine blastocyst production *in vitro* after inhibition of meiotic resumption for 24 h. *J Reprod Fertil* 109:355-365.

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.

Máximo, D.M. Características ultraestruturais de ovócitos ovinos durante a maturação *in vitro*. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 51p. Dissertação de mestrado.

Meinecke B, Janas U, Podhajsky E, Meinecke-Tillmann S. Histone H1 and MAP Kinase Activities in Bovine Oocytes following Protein Synthesis Inhibition. 2001. *Reprod Dom Anim* 36:183-188.

Nagano M, Katagiri S, Takahashi Y. 2006. Relationship between bovine oocyte morphology and *in vitro* developmental. *Zygote* 14:53-61.

O'Brien JK, Dwarto D, Ryan JP, Maxwell WM, Evans G. 2005. Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reprod Fertil Dev* 8:1029-1037.

Pincus G, Enzmann EV. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Med* 62:665-675.

Rizos D, Lonergan P, Ward F, Duffy P, Boland MP. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61:234-248.

Saeki K, Nagao LY, Kishi M, Nagai M. 1997. Developmental capacity of bovine oocytes following inhibition of meiotic resumption by cycloheximide or 6-dimethylaminopurine. *Theriogenology* 46:1161-1172.

Schoevers EJ, Bevers MM, Roelen BAJ, Colenbrander B. 2005. Nuclear and cytoplasmic maturation of sow oocytes are not synchronized by specific meiotic inhibition with roscovitine during in vitro maturation. *Theriogenology* 63:1111-1130.

Senger PL, Saacke RG. 1970. Unusual mitochondria of the bovine oocyte. *The Journal of Cell Biology* 46:405-408.

Shi L, Yue W, Zhang J, LV L, Ren Y, Yan P. 2009. Effect of ovarian cortex cells on nuclear maturation of sheep oocytes during in vitro maturation. *Anim Reprod Sci* 113:299-304.

Shirazi A, Sadeghi N. 2007. The effect of ovine oocyte diameter on nuclear maturation. *Small Rumin Res* 69:103-107.

Shoubridge EA, Wai T. 2007. Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte. *Cur Top Dev Biol* 77:87-111.

Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, Wolf E. 2001. 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* 64:904-909.

Takayama O, Dochi O, Koyama H. 2006. Effect of meiotic arrest by cycloheximide on the in vitro maturation of bovine oocytes and their subsequent development following in vitro fertilization. *J Mamm Ova Res* 23:67-71.

Tanghe S, Soom AV, Nauwynck H, Coryn M, De Kruif A. 2002. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization. **Mol Reprod Dev** 61:414 - 424.

Wu C, Rui R, Dai J, Zhang C, Ju S, Xie B, Lu X, Zheng X. 2006. Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 73:1454-1466.

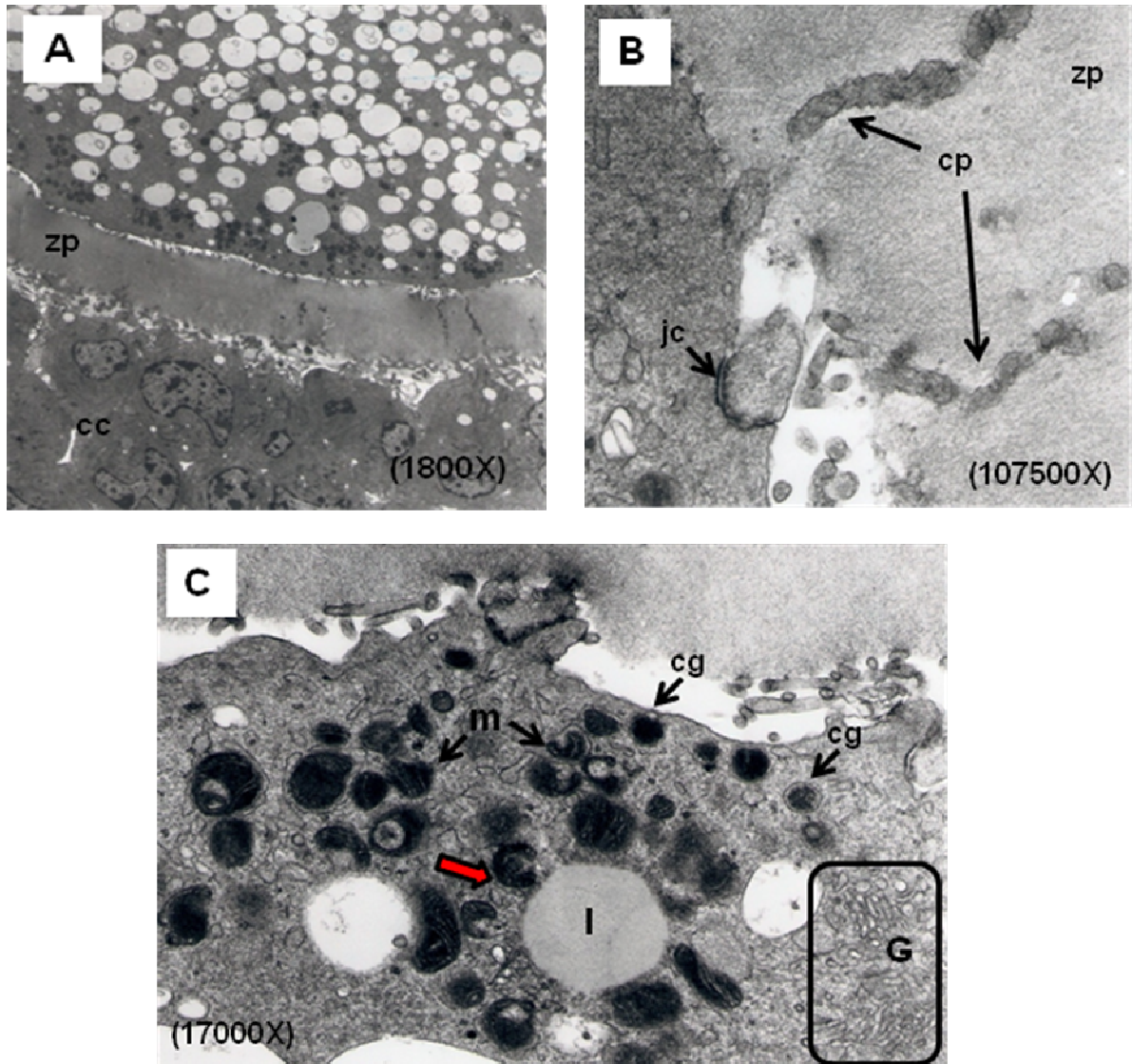


Figure 1: Electron micrograph showing morphological aspects of an immature ovine COCs: (A) note the large amount of lipid droplets disperse throughout the ooplasm; nonexpanded *cumulus* cells (cc) and previtelline space undeveloped; (B) cytoplasmic projections (cp) of *cumulus* cells through the zona pellucida (zp) and junctional complex (jc) can also be observed; (C) Clusters of pleomorphic mitochondrias (m) were found associated with lipid granules (l), constituting the metabolic units (red arrow); note the aspect of mitochondrias: round, elongated and some with an arc-like projection. Well developed Golgi complex (G) and few cortical granules (cg) heterogeneous in size and coloration were also detected.

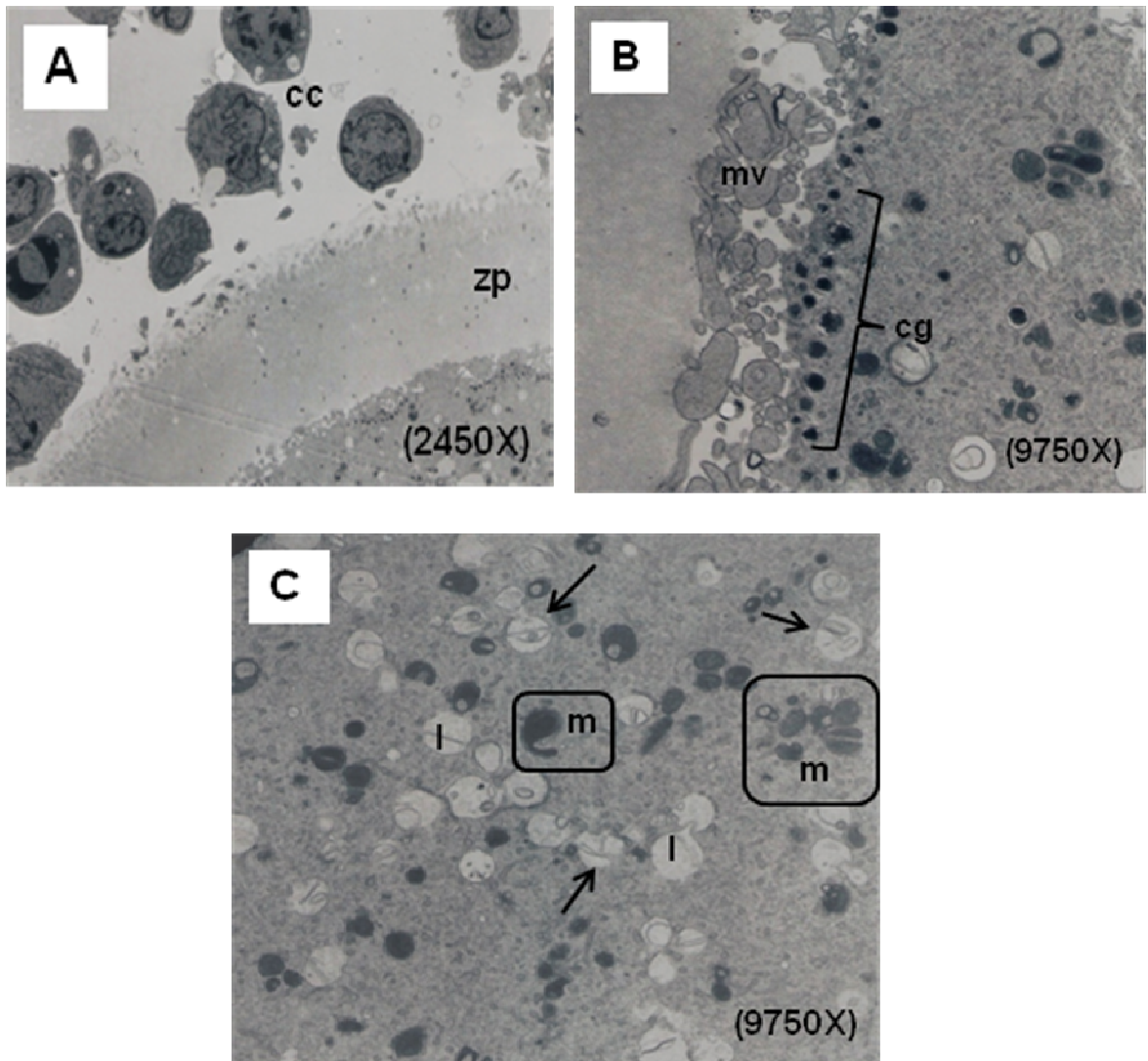


Figure 2: Electron micrograph showing morphological aspects of ovine COCs after *in vitro* culture for 24 hours without inhibitors. COCs treated for 24 hours with 1 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide showed these same characteristics: (A) note the full expansion *cumulus* cells (cc) with substantial loss of cells and absence of cytoplasmic projections of *cumulus* cells through the zona pellucida (zp); (B) perivitelline space well developed, plasma membrane with several microvilli (mv); absence of junctional complexes and large amount of cortical granules (cg) isolated and aligned with the oocyte plasma membrane can also be observed; (C) note the general aspect of ooplasm: large amount of pleomorphic mitochondria (m), few lipid granules (l) and many myelin figures (arrow) dispersed throughout the ooplasm.

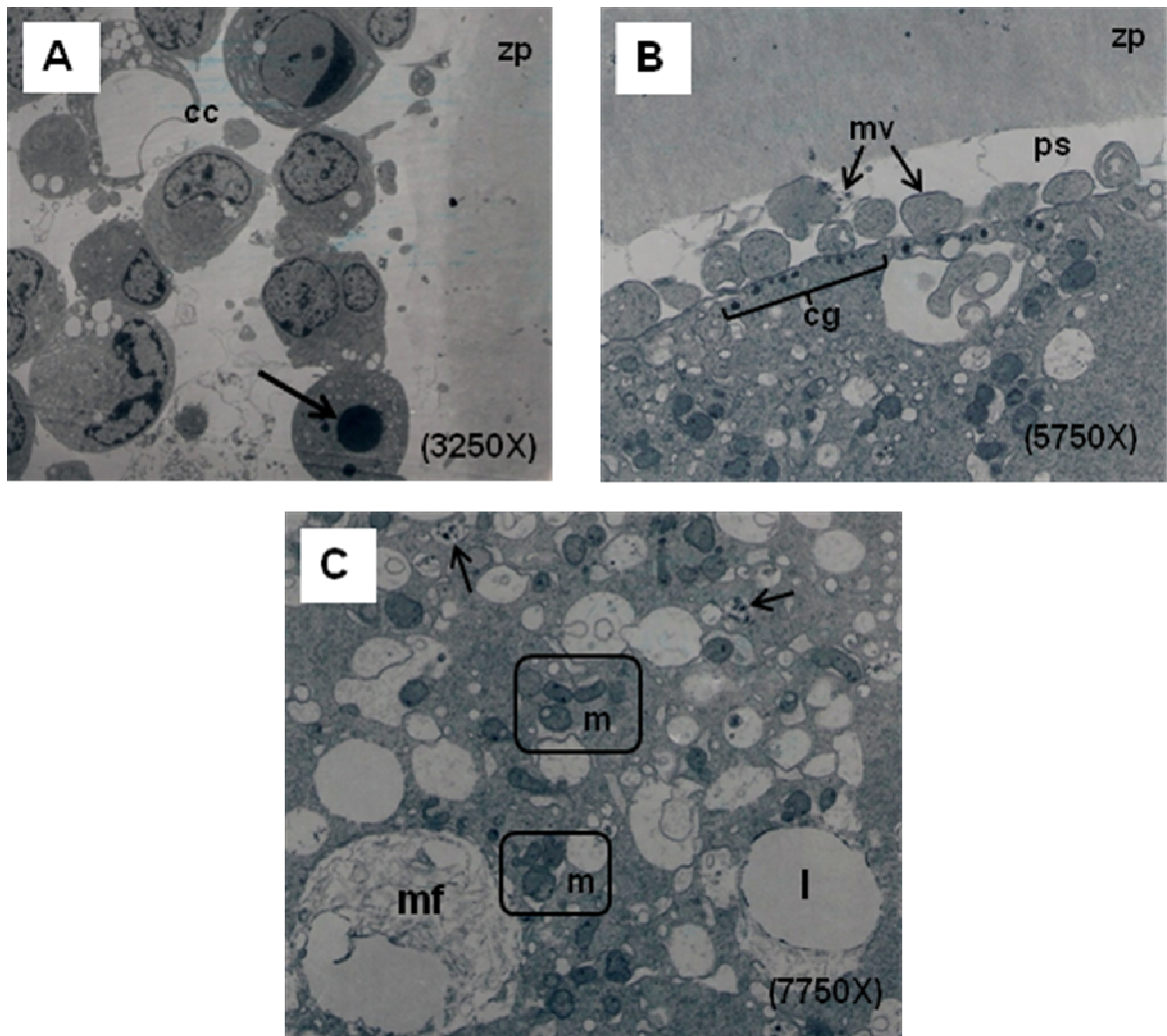


Figure 3: Electron micrograph showing morphological aspects of ovine COCs after *in vitro* culture for 24 hours with 100 μM roscovitine: (A) note the partial *cumulus* cells (cc) expansion and degeneration signs as nuclei pyknotic (arrow); (B) perivitelline space (ps) well developed, plasma membrane with few microvilli (mv) dilated, absence of cytoplasmic projections of *cumulus* cells through the zona pellucida (zp), absence of junctional complexes and few cortical granules (cg) isolated and aligned with the oocyte plasma membrane can also be observed; (C) note general aspect of ooplasm: large amount of lipid droplets (l) and myelin figures (mf), some electron-lucent vesicles with electron-dense material (arrow) and many pleomorphic mitochondrias (m) were found disperse throughout the ooplasm. The mitochondrias appeared to be less electron-dense and swollen, and some of them displayed mitochondrial granules.

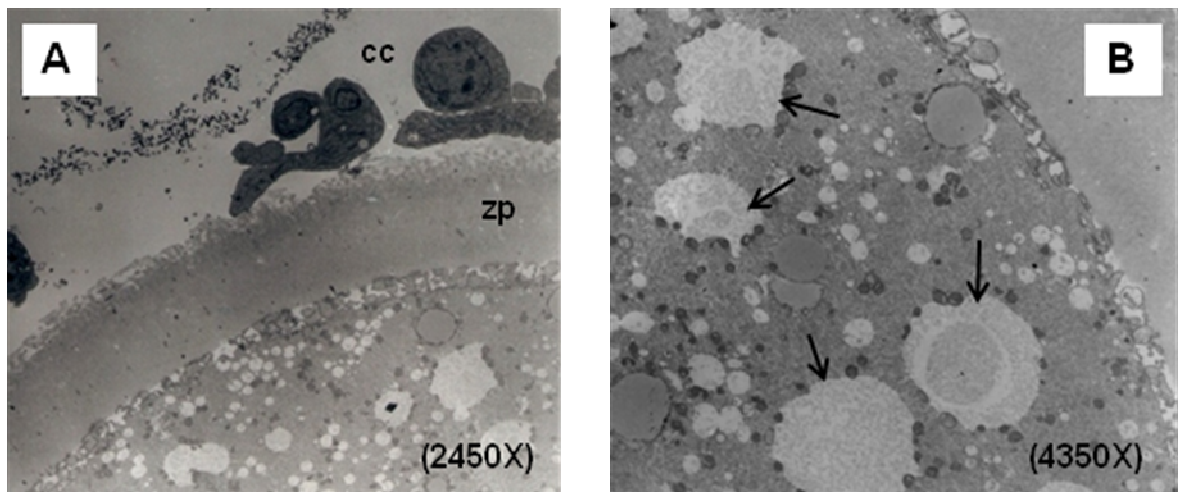


Figure 4: Electron micrograph showing morphological aspects of ovine COCs after *in vitro* culture for 46 hours without inhibitors. COCs treated with 100 μ M roscovitine and then *in vitro* culture for more 22 hours in inhibitor-free medium showed these same characteristics: (A) full expansion, dispersion and substantial loss of *cumulus* cells (cc); (B) degeneration signs in the ooplasm, as several areas of cytoplasmic matrix absence (arrows).

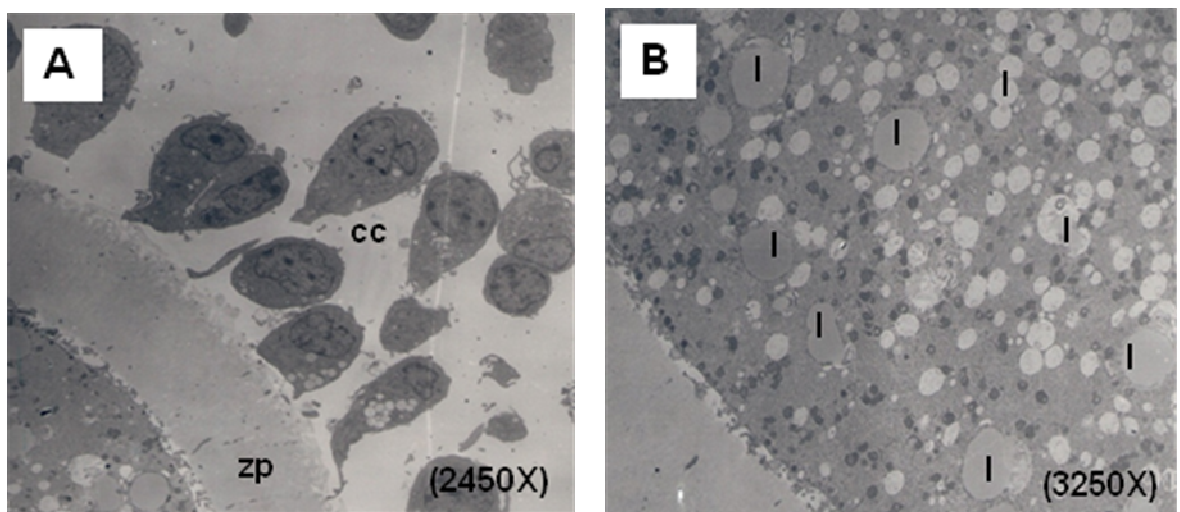


Figure 5: Electron micrograph showing morphological aspects of ovine COCs treated for 24 hours with 1 μ g/mL cycloheximide and then *in vitro* culture for more 22 hours in inhibitor-free medium. (A) full *cumulus* expansion without substantial loss of cells ; (B) large amount of lipid granules (l) evenly distributed throughout the ooplasm.

