



---

Universidade de Brasília

FACULDADE DE MEDICINA

**INGRID DE OLIVEIRA E SILVA**

**INIBIÇÃO E REVERSÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR, AVALIAÇÃO DA  
MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA E PRODUÇÃO DE ESTERÓIDES EM  
COMPLEXOS *cumulus oophorus* BOVINOS CO-CULTIVADOS COM HEMI-  
SECÇÕES FOLICULARES EM MEIO DE CULTURA DEFINIDO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**BRASÍLIA/ DF**

**FEVEREIRO/2008**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA**

**INGRID DE OLIVEIRA E SILVA**

**INIBIÇÃO E REVERSÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR, AVALIAÇÃO DA  
MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA E PRODUÇÃO DE ESTERÓIDES EM  
COMPLEXOS *cumulus oophorus* BOVINOS CO-CULTIVADOS COM HEMI-  
SECÇÕES FOLICULARES EM MEIO DE CULTURA DEFINIDO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**ORIENTADORA: ALZIRA AMÉLIA MARTINS ROSA E SILVA**

**BRASÍLIA/DF  
FEVEREIRO/2008**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, IO

Inibição e reversão da maturação nuclear, avaliação da maturação citoplasmática e produção de esteróides em complexos *cumulus oophorus* bovinos co-cultivados com hemi-seções foliculares em meio de cultura definido.

Ingrid de Oliveira e Silva; orientação de Alzira Amélia Martins Rosa e Silva. – Brasília, 2008.

84p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Medicina, 2008.

1. Pré-maturação. 2. Competência oocitária. 3. Biotecnologia. I. Rosa e Silva AAM. II.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Silva, I. O. Inibição e reversão da maturação nuclear, avaliação da maturação citoplasmática e produção de esteróides em complexos *cumulus oophorus* bovinos co-cultivados com hemi-seções foliculares em meio de cultura definido. Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2008, 84 p. Dissertação de Mestrado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Ingrid de Oliveira e Silva

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Inibição e reversão da maturação nuclear, avaliação da maturação citoplasmática e produção de esteróides em complexos *cumulus oophorus* bovinos co-cultivados com hemi-seções foliculares em meio de cultura definido.

GRAU: Mestre      Ano: 2008

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA**

**INGRID DE OLIVEIRA E SILVA**

**Inibição e reversão da maturação nuclear, avaliação da maturação citoplasmática e produção de esteróides em complexos *cumulus oophorus* bovinos co-cultivados com hemi-seções foliculares em meio de cultura definido.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS MÉDICAS  
NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**APROVADA POR:**

**ALZIRA AMÉLIA MARTINS ROSA E SILVA UnB  
(ORIENTADORA)  
[aamresil@unb.br](mailto:aamresil@unb.br)**

**CAROLINA MADEIRA LUCCI UnB  
(EXAMINADORA INTERNA)  
[cmlucci@unb.br](mailto:cmlucci@unb.br)**

**LUCÍLIA DOMINGUES CASULARI DA MOTTA UnB  
(EXAMINADORA INTERNA)  
[lacasulari@unb.br](mailto:lacasulari@unb.br)**

**BRASÍLIA/DF 12 DE FEVEREIRO DE 2008.**

*Mãe, tia Dite, tio Milton e Rodrigo,  
dedico a vocês estes anos de trabalho, pois vocês foram o suporte  
sem o qual não teria conseguido.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por sempre me proteger e guiar meus passos.

À professora Alzira, pelos ensinamentos e por ser mais que uma orientadora, uma amiga com a qual eu sei que sempre poderei contar. Muito obrigada!

Aos meus pais, André e Nelcy, que são responsáveis pela pessoa que sou hoje, obrigada pelo amor, pelas correções, criação e educação.

À minha mãe, que sempre me incentivou e me deu força pra não desistir nunca dos meus objetivos e me ensinou a nunca parar nada pela metade, por que é pra frente que se anda.

Ao meu amor Rodrigo pelo carinho, paciência, apoio, amor incondicional, sem os quais não teria conseguido vencer os momentos de saudade, carência e medo. Te amoooooooooooo!!!

A todos os meus familiares que torceram por mim, mas principalmente tia Edith, tio Milton, tia Lyly, tio Zely, tia Léa e Maxwel, que me apoiaram muito e não me deixaram nem pensar em desistir no meio do caminho.

Aos meus irmãos Inglison e Isabelle pelo carinho, amizade, companheirismo e por me apoiarem nesta etapa.

A todos os meus amigos, primos, pessoas que longe ou perto torcem por mim e sempre estarão no meu coração.

À família Campos Filgueiras, da qual já me sinto um membro, pelo incentivo e força. Ao Thiago também pela ilustração da revisão bibliográfica. Ficou linda!

Ao Dr Wanderlei, responsável pelo início da concretização deste sonho, muito obrigada por tudo! Pela amizade e conhecimentos proporcionados.

A Alessandra Vireque, sem você não estaria aqui em Brasília hoje, e nem teria feito mestrado com a profa Alzira. Muito obrigada por me ensinar as técnicas que eu mais precisei para a conclusão deste mestrado.

À UnB, FAPDF, PRONEX e CAPES por proporcionarem a realização deste.

A todos do Laboratório Integrado, pela convivência e amizade durante estes anos.

Às minhas companheiras e amigas do laboratório, Rô, Laura, Luciana Guilhem, Luciana Lana, Dany Cris, muito obrigada pela amizade, pelas conversas e momentos agradáveis vividos, pelo incentivo, carinho... Sem a ajuda de vocês tudo teria sido muito mais difícil!

Ao menino de ouro, João Victor, que caiu do céu pra me ajudar na microscopia eletrônica, muito obriga mesmo! E também pela sua amizade.

À minha família de Brasília, Bruna, Liudy e Rô, sem a amizade de vocês não teria sobrevivido a esta cidade.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de reprodução da Embrapa Gado de Leite: Alessandra R., Alessandra V., Del, Diogo, Elisa, Isabela, Joel, Juliana, Margot, Mariana, Michele, Miro, Raquel, Renata, Ríbrio, muito obrigada por tudo! Pela convivência, pelos conhecimentos, brincadeiras... Vocês estarão sempre no meu coração.

Ao Dr Luís Sérgio, pela oportunidade de voltar a estagiar na Embrapa para a conclusão de uma parte deste trabalho e por sempre se dispor a ajudar para a realização do mesmo.

À professora Mônica e ao professor Ricardo, do módulo 7, que cederam o laboratório de cultura de células onde pudemos iniciar os experimentos.

À Dra Margot e sua estagiária Ligiane, por me ajudarem com a técnica de avaliação do estágio de maturação dos oócitos.

À professora Sônia Bão, por sempre disponibilizar o laboratório de microscopia eletrônica.

À professora Connie, pela análise estatística.

À professora Anamélia, pela atenção dispensada.

Ao laboratório de Doença de Chagas e de Farmacologia por disponibilizarem equipamentos necessários para a conclusão deste trabalho.

À Zilda, Roberta e Flávia que me acolheram no momento mais difícil, logo que eu me mudei pra Brasília, muitíssima obrigada!!! Sem este apoio inicial não sei se teria tido forças pra continuar aqui.

À D. Tereza e à Roberta pela amizade e pela hospedagem quando fui fazer a prova de seleção para o mestrado.

Às minhas amigas Ana Luiza e Marina, pela amizade e por me agüentarem todos os dias em casa.

Às meninas e ao menino que já passaram pelo laboratório: Eveline, Juliana, Lívia, Daniele e Rodrigo muito obrigada pela amizade e por também terem ajudado em alguma etapa da realização deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, por toda atenção dispensada.

Aos docentes com os quais tive a oportunidade de ampliar meus conhecimentos muito obrigada.

Aos proprietários e funcionários dos matadouros que cederam os ovários para a realização deste trabalho.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AI – Anáfase I

ATP – Adenosina trifosfato

BSA – Albumina sérica bovina

3 $\beta$ -HSD – Enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase

17 $\beta$ -HSD – Enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase

cAMP – Adenosina monofosfato cíclico

CC – Células do *cumulus*

CG – Células da granulosa

COC – Complexo *cumulus oophorus*

CSF – Fator citostático

CT – Células da teca

Cx 43 – Conexina 43

6- DMAP – 6-Dimethylaminopurina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DRB – 5,6-dicloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole

EGF – Fator de crescimento epidermal

EPV – Espaço perivitelínico

E2 – 17 $\beta$  estradiol

FF – Fluido folicular

FSH – Hormônio folículo estimulante

GC – Grânulo cortical

GV – Vesícula germinativa

GVBD – Quebra da vesícula germinativa

hn-RNA – RNA heterogêneo (Precursor do mRNA)

HS – Hemi-seções foliculares

IGF-I – Fator de crescimento semelhante a insulina tipo I

LH – Hormônio luteinizante

M – Microvilosidades

MAPKs – Proteínas quinases ativadoras de mitógenos

MEK – Quinase específica da MAPK

MI – Metáfase I

MIV – Maturação *in vitro*



MII – Metáfase II

*mos* – Proto - oncogene

MPF – Fator promotor da maturação

mRNA – RNA mensageiro

OMI – Inibidor da maturação do oócito

PBI – Primeiro corpúsculo polar

PIVE – Produção *in vitro* de embriões

PKA – Proteína quinase A

PVA – Álcool polivinílico

PI – Prófase I

P34 CDC2 – Subunidade catalítica do MPF

P4 – Progesterona

P450arom – Enzima P450 aromatase

P450c17 – Enzima 17 $\alpha$  hidroxilase

P450scc – Enzima P450 side chain cleavage

RE – Retículo endoplasmático

Rh-FSH – FSH recombinante humano

RNA – Ácido ribonucleico

SFB – Soro fetal bovino

Star – Proteína de regulação aguda da esteroidogênese

TI – Telófase I

ZP – Zona pelúcida

Inibição e reversão da maturação nuclear, avaliação da maturação citoplasmática e produção de esteróides em complexos *cumulus oophorus* bovinos co-cultivados com hemi-seções foliculares em meio de cultura definido.

## RESUMO

O presente trabalho teve o objetivo de padronizar um protocolo de pré-maturação, onde complexos *cumulus oophorus* (COCs- do inglês *cumulus oocyte complex*) bovinos imaturos são co-cultivados com hemi-seções foliculares (HS) em meio definido ( $\alpha$ -MEM+PVA). No experimento 1 foi avaliado, o efeito deste co-cultivo pelo período de 24 horas na manutenção do estágio imaturo dos COCs. Os grupos experimentais avaliados foram: G1=TCM-199+SFB+COCs; G2=TCM-199+SFB+HS+COCs; G3= $\alpha$ -MEM+PVA+COCs; G4= $\alpha$ -MEM+PVA+HS+COCs. No experimento 2, foi feita a avaliação do potencial de reversibilidade do processo inibitório após a pré-maturação, cultivando os COCs previamente pré-maturados em meio de maturação padrão (TCM-199+SFB). Os meios de cultivo destes experimentos foram armazenados a  $-20^{\circ}$  C para posterior dosagem dos hormônios estradiol (E2) e progesterona (P4) com a utilização de kits de radioimunoensaio. Em média 4 COCs de cada tratamento dos experimentos 1 e 2 foram processados para análise da maturação citoplasmática ao microscópio eletrônico de transmissão. Os resultados do experimento 1 mostram que, os tratamentos G2, G3 e G4 foram efetivos na inibição da progressão da meiose, com respectivamente 81,2; 74,0 e 96,3% dos COCs imaturos. O tratamento G1 (controle) apresentou ao final do tempo de cultivo 83,1% de COCs maduros;  $P < 0,05$ . No experimento 2, somente os grupos G1 e G3 apresentaram mais de 80% de oócitos maduros ao final das 24 horas de cultura em meio padrão. Os grupos G2 e G4 apresentaram apenas 29,1 e 16,3% respectivamente dos COCs maduros ao final do cultivo;  $P < 0,05$ . A dosagem dos hormônios esteróides mostrou no experimento 1, que o grupo G3 apresentou a maior produção de E2 (2444,24 pg/mL) e menor produção de P4 (3,47 ng/mL);  $P < 0,0001$ . A produção de P4 foi máxima no grupo G2 (77,87 ng/mL). A presença das HS promoveu o aumento da produção deste hormônio nos grupos G2 e G4. No experimento 2, a concentração de E2 foi maior no grupo pré-maturado em meio definido, assim como a concentração de P4, que foi significativamente maior neste tratamento (G3), 42,82 ng/mL;  $P < 0,0032$ . A análise ultraestrutural dos COCs mostrou que a presença das HS (grupos G2 e G4) provoca a morte destes ainda no período de pré-maturação. No grupo G3, foi observado que o meio de cultivo  $\alpha$ -MEM+PVA promoveu o início da maturação citoplasmática durante a pré-maturação. No

experimento 2, este processo foi completado após o cultivo em meio de maturação padrão. Conclui-se portanto que o meio de cultura  $\alpha$ -MEM+PVA fornece um ambiente adequado para que os COCs sofram a pré-maturação, já que a relação E2:P4 neste sistema é condizente com a fase em que os COCs se encontram, além de que este meio propicia uma alta taxa de inibição da maturação nuclear seguida de uma grande porcentagem de reversão desta inibição. Outro fato importante foi que a maturação citoplasmática foi iniciada ainda no período de pré-maturação, e chegou a termo durante a maturação *in vitro*. O co-cultivo com HS, no entanto, não gerou resultados promissores.

Palavras-chave: Pré-maturação; oócito; meio definido.

Inhibition and reversibility of nuclear maturation, assessment of cytoplasmic maturation and steroids production in bovine *cumulus* oocyte complex co-cultured with follicular hemessections in defined medium culture.

#### ABSTRACT

This study aimed to standardize a physiological protocol of pre-maturation, where immature bovine *cumulus* oocyte complex (COCs) are co-cultured with follicular hemessections (HS) in defined medium ( $\alpha$ -MEM + PVA). In the first experiment it was evaluated, the effect of this co-culture for the period of 24 hours in the maintenance of COCs' immature stage. The following experimental groups evaluated were: G1=TCM-199 +FCS+COCs; G2=TCM-199+FCS+HS+COCs; G3= $\alpha$ -MEM+PVA+COCs; G4= $\alpha$ -MEM+PVA+HS+COCs. The experiment 2 was performed to assess the reversibility potential of the inhibitory process after the pre-maturation. COCs previously pre-matured were cultured in standard medium of maturation (TCM-199 + SFB). The culture medium of these experiments were stored at -20° C for later dosage of hormones estradiol (E2) and progesterone (P4) with radioimmunoassay kits. On average 4 COCs of each treatment of experiments 1 and 2 were processed for cytoplasmic maturation analysis at the transmission electron microscope. The results of the experiment 1 show that the treatments G2, G3 and G4 were effective in maintain meiotic arrest, with 81.2, 74.0 and 96.3% respectively of immature COCs. Treatment G1 (control) showed at the end of culture 83.1% of mature COCs,  $P < 0.05$ . In experiment 2, only the groups G1 and G3 showed more than 80% of mature oocytes at the end of 24 hours of culture in the medium standard. The groups G2 and G4 had only 29.1 and 16.3% respectively of the mature COCs at the end of the culture,  $P < 0.05$ . The dosage of steroid hormones in

Experiment 1 showed that the G3 had the highest production of E2 (2444.24 pg / mL) and lower production of P4 (3.47 ng / mL),  $P < 0.0001$ . The production of P4 was the highest in group G2 (77.87 ng / mL). Due the presence of HS there was an increasing production of this hormone in groups G2 and G4. In experiment 2, the concentration of E2 was higher in group pre-matured in defined medium, as well as the concentration of P4, which was significantly higher in this treatment, 42.82 ng / mL,  $P < 0.0032$ . The ultrastructural analysis of the COCs showed that the presence of HS (groups G2 and G4) causes the cellular death still in the pre-maturation culture. In group G3, it was observed that the medium  $\alpha$ -MEM + PVA promoted the beginning of the cytoplasmic maturation during the pre-maturation. In experiment 2, this process has been completed after culture in standard maturation medium. It comes to the conclusion that the culture  $\alpha$ -MEM + PVA provides a suitable environment for the COCs suffer a pre-maturation, as the relationship E2: P4 in this system is consistent with the stage in which the COCs are. In addition, this system provides a high rate of inhibition of nuclear maturation followed by a large percentage of reversal of this inhibition. Another important fact is that the cytoplasmic maturation began still in the pre-maturation period, and finished during in vitro maturation. The co-culture with HS, didn't generate promising results.

Keywords: Pre-maturation; oocyte; defined medium.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. OBJETIVOS</b>	3
<b>3. REVISÃO</b>	4
<b>3.1. Maturação oocitária</b>	4
3.1.1. <i>Maturação in vivo x in vitro</i>	4
3.1.2. <i>Maturação nuclear e oogênese</i>	6
3.1.3. <i>Maturação citoplasmática</i>	12
3.1.3.1. <i>Modificações ultraestruturais no oócito durante a foliculogênese</i>	12
3.1.4. <i>Maturação molecular</i>	14
<b>3.2. Mecanismos de inibição da retomada da meiose</b>	17
3.2.1. <i>Inibidores de transcrição</i>	17
3.2.2. <i>Inibidores de síntese proteica</i>	19
3.2.3. <i>Inibidores de atividade quinase</i>	20
3.2.4. <i>Inibidores fisiológicos</i>	22
<b>3.3. Esteroidogênese folicular</b>	26
<b>3.4. Sistemas de cultura definidos e indefinidos</b>	29
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	32
<b>4.1. Meios de cultivo</b>	32
<b>4.2. Coleta e manipulação dos ovários</b>	32
<b>4.3. Preparo das hemi-seções foliculares</b>	33
<b>4.4. Recuperação dos oócitos</b>	33
<b>4.5. Delineamento experimental</b>	34
<b>4.6. Análise estatística</b>	39
<b>5. RESULTADOS</b>	40
<b>6. DISCUSSÃO</b>	60
<b>7. CONCLUSÃO</b>	70
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	71

## 1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho é parte de um projeto mais amplo (Projeto Pronex 193000117/2004), que visa a construção de um folículo pré-ovulatório mimético *in vitro*, com produção crescente de estradiol (E2), que irá possibilitar análises acerca dos fatores que interferem na foliculogênese, maturação oocitária e produção de embriões *in vitro*.

O entendimento do diálogo endócrino entre as células foliculares certamente contribuirá para o aperfeiçoamento da técnica de produção *in vitro* de embriões, de importância capital tanto na “saúde reprodutiva” humana, revertendo casos de infertilidade, como na produção animal, expandindo as possibilidades de manutenção dos genes de animais domésticos de alto potencial genético, e também revertendo prognósticos de extinção em animais silvestres.

A produção de embriões viáveis, sem dúvida é o fator limitante de todo processo reprodutivo, principalmente quando focalizamos as biotecnologias reprodutivas. Conhecer suas principais etapas e seus complexos mecanismos, destacando-se dentre esses a foliculogênese e a maturação oocitária, permitirá uma produção animal à menor custo, a prevenção de espécies ameaçadas de extinção, além de possibilitar a perpetuação de genes.

Merece realce o estudo da foliculogênese e da maturação oocitária uma vez que a geração de embriões viáveis depende intrinsecamente do oócito que se torna competente, sofrendo corretamente os processos de maturação nuclear, citoplasmática e molecular, sendo este oriundo de um folículo que cresceu e se tornou dominante.

Portanto, há urgência e necessidade de se desenvolver técnicas que apontem novos conhecimentos propiciando uma renovação conceitual tanto da foliculogênese como da

maturação oocitária, uma vez que há uma diferença significativa quando as taxas de produção de embriões *in vivo* e *in vitro* são comparadas (PETERS, 1996; WRENZYCKI *et al*; 2004).

Na produção *in vitro* de embriões, devido ao fato de serem utilizados oócitos de folículos imaturos, torna-se necessária a maturação *in vitro* (MACHALKOVA *et al*, 2004), um dos prováveis fatores causadores da reduzida taxa de produção de embriões *in vitro*.

Experimentos realizados mostram que a remoção do oócito do folículo ovariano resulta na luteinização espontânea das células da granulosa (CG) e na retomada da meiose pelo oócito (LANUZA *et al*, 1998; TSAFRIRI e POMERANTZ, 1984). Tais eventos ocorrem pela perda da sinalização oócito-células da granulosa realizada via junções *Gap*. Quando esta sinalização é perdida, através da retirada do oócito do ambiente folicular, ocorre a retomada da meiose (maturação nuclear), que por sua vez leva a inibição da maturação citoplasmática uma vez que esta só ocorre quando o oócito está em GV (vesícula germinativa, do inglês-germinal vesicle), devido ao estágio descondensado dos cromossomos (DE SOUZA *et al*, 1998; LONERGAN *et al*, 1994). Observa-se então, uma perda na sincronia entre maturação citoplasmática e nuclear, o que influencia negativamente a aquisição de competência oocitária e provavelmente promove a reduzida taxa de produção de embriões *in vitro*.

Para tentar resolver este problema, várias modificações nas condições de maturação utilizadas atualmente têm sido propostas, tais como o estabelecimento de dois passos de cultivo, incluindo uma pré-maturação do oócito na presença de um inibidor de maturação nuclear, ou co-cultivo com células, ou tecidos foliculares, para que possa haver uma melhor sincronização entre os processos de maturação nuclear e citoplasmática (FRANZ *et al*, 2002; LE BEAUX *et al*, 2003; MACHALKOVA *et al*, 2004; SIRARD *et al*, 1993; 1992).

Este trabalho propõe a montagem de um sistema de co-cultivo dos elementos fundamentais do folículo ovariano, células da teca, granulosa e *complexos cumulus oophorus* (COCs) em meio definido ( $\alpha$ -MEM+PVA), com o objetivo de padronizar um protocolo de pré-maturação de COCs bovinos imaturos, visando aumentar a competência para o desenvolvimento dos oócitos utilizados na produção *in vitro* de embriões.

## 2. OBJETIVOS

### GERAL

Padronização de um protocolo de pré-maturação onde COCs bovinos imaturos sejam co-cultivados com a hemi-secção folicular, visando aumentar a competência para o desenvolvimento dos oócitos utilizados na produção *in vitro* de embriões.

### ESPECÍFICOS

1- Avaliar o efeito da pré-maturação realizada através do co-cultivo de hemi-secções foliculares e COCs bovinos imaturos em meio definido ( $\alpha$ -MEM+PVA) e em meio complexo (TCM-199 + SFB), na manutenção do estágio imaturo do núcleo dos COCs;

2- Avaliar o potencial de reversibilidade do processo de inibição da progressão da meiose dos COCs previamente pré-maturados, através do cultivo destes em meio de maturação padrão (TCM-199 + SFB) livre de inibidores, ou seja, sem tecido folicular;

3- Fazer a determinação da concentração dos hormônios esteróides estradiol e progesterona presentes nos meios de cultivo referentes aos objetivos específicos 1 e 2;

4- Avaliar a maturação citoplasmática dos COCs que foram pré-maturados e dos COCs que foram pré-maturados e posteriormente cultivados em meio de maturação padrão.



### 3. REVISÃO

#### 3.1. Maturação oocitária

##### 3.1.1. Maturação *in vivo* x *in vitro*

Na produção de embriões *in vivo*, aproximadamente 81% dos oócitos ovulados se desenvolvem em embrião até o 13º dia da fecundação quando avaliados pela taxa de concepção (PETERS, 1996), enquanto que na produção de embriões *in vitro*, a taxa de desenvolvimento embrionário até o 7º dia da fecundação encontra-se entre 30 e 40% (WRENZYCKI *et al*; 2004). Existem indicações de que esta diferença na taxa de produção de embriões é também influenciada pela diferença na competência de desenvolvimento entre os oócitos, além das circunstâncias da PIVE.

Na PIVE, trabalha-se com uma população heterogênea de oócitos, uma vez que estes são obtidos de folículos imaturos. Portanto, os oócitos utilizados encontram-se em estágios diferentes de maturação, o que leva a diferenças importantes nos resultados da PIVE (DODE *et al*, 1996; HENDRIKSEN *et al*, 2000; MACHALKOVA *et al*, 2004; PAVLOK *et al*, 1992).

Estudos indicam que folículos menores que 8 mm possuem mRNA para receptores de hormônio folículo estimulante (FSH) nas células da granulosa murais e mRNA para receptores de hormônio luteinizante (LH) somente nas células da teca (XU *et al*, 1995). Então, fica claro que a regulação da maturação *in vivo* difere da regulação da maturação *in vitro*, uma vez que folículos pré-ovulatórios (> 8 mm), com receptores de LH nas células da granulosa respondem não só ao pico de LH, mas também à secreção pulsátil deste, que antecede o pico ovulatório. Assey *et al* (1994) conclui que as alterações nucleares e citoplasmáticas

promovidas no oócito, denominadas de modificações pré-maturacionais, são devidas à responsividade do folículo à pulsatilidade do LH antes do pico ovulatório, sendo estas modificações pré-requisitos para o oócito alcançar a competência.

Portanto, um dos pontos-chave da produção de embriões tanto *in vivo*, quanto *in vitro* é o processo de maturação oocitária, pois é nesta etapa que o oócito adquire competência, ou seja, ele se torna capaz de completar a maturação, ser fertilizado e suportar o desenvolvimento embrionário inicial, até que haja a transição materno-zigótica (HYTTEL *et al*, 1997).

Estudos demonstram que a capacidade para o desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos maturados *in vivo* é superior àqueles maturados *in vitro* (SIRARD e BLONDIN, 1996). Esta hipótese é suportada pelo fato que oócitos coletados para a PIVE que provém de folículos dominantes antes do pico de LH geram uma taxa de 50% de blastocistos, enquanto que oócitos recuperados de folículos entre 2-6 mm de diâmetro geram cerca de 30% (HYTTEL *et al*, 1997). Porém, como a obtenção de ovários de abatedouro é fácil e barata, a técnica de maturação *in vitro* tornou possível a produção de embriões *in vitro* em larga escala.

A maturação nuclear normalmente é induzida *in vivo* pelo pico de LH. *In vitro*, no entanto, esta ocorre espontaneamente quando os oócitos são removidos do folículo e cultivados em meio de maturação (PINCUS e ENZMANN, 1935). Isto ocorre porque quando o complexo *cumulus oophorus* (COC) é removido do ambiente folicular, ele perde o contato com as células da granulosa murais do folículo com as quais estabelecia uma rede de comunicação por meio de junções *Gap* (BYSKOV *et al*, 1997; DOWNS, 1995). O rompimento desta barreira químico-física promove a condensação da cromatina e quebra da membrana nuclear (vesícula germinativa) fazendo com que a maturação nuclear que estava bloqueada em prófase I da meiose, progrida até metáfase II (EDWARDS, 1965). Para explicar este fenômeno há a hipótese de que as células foliculares produzem um fator inibidor que mantém o oócito com a meiose bloqueada (WASSERMAN, 1994).

No entanto, oócitos não sofrem apenas maturação nuclear, mas também maturação citoplasmática e molecular, nas quais mudanças como rearranjo de organelas (FAIR *et al*, 1997) e síntese de proteínas e mRNA (WU *et al*, 1996) são cruciais para a fertilização e posterior desenvolvimento embrionário.

Os protocolos de maturação *in vitro* (MIV) utilizados pela maioria dos laboratórios utilizam soro no meio de maturação, pois este é fonte de vários hormônios e fatores de crescimento. No entanto, uma vez que a concentração ou a presença destes hormônios é desconhecida, não é possível fazer a padronização da técnica e o estudo detalhado dos fatores

que realmente influenciam para que o processo de maturação ocorra de forma mimética ao processo *in vivo*, gerando a mesma taxa de embriões (FRESHNEY, 2000).

### 3.1.2. Oogênese e Maturação nuclear

A oogênese em mamíferos é iniciada ainda na vida embrionária e só termina na idade reprodutiva. Esta se inicia com a formação das células germinativas primordiais, as quais migram para o epiblasto embrionário, na crista genital. Uma vez estabelecidas no ovário em desenvolvimento, estas células perdem sua motilidade e são chamadas de oogônias. As oogônias sofrem várias mitoses antes de iniciarem a meiose (maturação nuclear), quando então são chamadas de oócitos (PINCTON, 1998). Os oócitos iniciam o processo de maturação oocitária, ainda na vida embrionária, mas este só irá ser concluído com a fertilização do gameta.

O objetivo central da maturação nuclear é a produção de um gameta haplóide ( $n$  cromossomos). Portanto, trata-se da divisão reducional dos cromossomos. A meiose então consiste de dois ciclos de divisão celular sem nova síntese de DNA. A primeira divisão separa os cromossomos homólogos e a segunda divisão separa as cromátides irmãs, formando os gametas haplóides. Na prática, trata-se da progressão do núcleo oocitário do estágio de Prófase I (PI), até o estágio de metáfase II (MII) da meiose, ou estágio maduro.

Oócitos de mamíferos ficam bloqueados no estágio de dictióteno da Prófase I, também conhecido como vesícula germinativa até terem completado seu desenvolvimento. A retomada da meiose é induzida *in vivo* pelo pico de LH, mas também pode ser induzida ao retirar o oócito do folículo para cultivá-lo *in vitro* (PINCUS e ENZMANN, 1935). Portanto, a meiose bloqueada se refere ao estágio nuclear dos oócitos dentro dos folículos, sendo que a retomada da meiose ocorre quando os oócitos são isolados do ambiente folicular e colocados em meio de maturação (HYTTEL *et al*, 1997 *apud* SIRARD *et al*, 1998).

Após a retomada da meiose, também chamada quebra da vesícula germinativa (GVBD- do inglês germinal vesicle breakdown), a maturação nuclear progride até metáfase II, estágio no qual a meiose é bloqueada novamente e só será retomada após fertilização (KUBELKA *et al*, 1988). Os eventos nucleares e citoplasmáticos que ocorrem durante este processo são chamados de maturação oocitária e são pré-requisitos para a formação de um oócito competente (ASSEY *et al*, 1994).

A habilidade de o oócito completar a meiose também é chamada de competência meiótica, a qual é adquirida gradualmente durante a foliculogênese. Os oócitos primeiro

adquirem capacidade para sofrer a quebra da vesícula germinativa e condensação cromossômica, depois, mais adiante no desenvolvimento folicular, é requerida a capacidade para progredir até a metáfase I (MI) (TSAFRIRI e CHANNING, 1975), e finalmente ele adquire habilidade para alcançar o estágio de metáfase II (MII) (SORENSEN e WASSARMAN, 1976).

Vários estudos têm buscado a compreensão da regulação do ciclo celular em oócitos de mamíferos para elucidar o que mantém a meiose bloqueada em GV desde a vida fetal até a idade reprodutiva, e o que faz com que ela progrida até MII e seja bloqueada novamente.

Dekel & Beers (1978) identificaram o cAMP como bloqueador da meiose em oócitos de ratas. A hipótese é que o cAMP gerado pelas células somáticas do folículo ovariano seja transmitido para o oócito via junções *Gap*. A retomada da meiose induzida pelo pico de LH, portanto, envolve a quebra da comunicação oócito - células foliculares, fazendo com que haja a diminuição da concentração intraoocitária de cAMP, resultando na saída do bloqueio meiótico (DEKEL *et al*, 1981). Também tem sido sugerido que a expressão de fosfodiesterase, exerce função no controle do nível de cAMP e, portanto, na maturação nuclear (TSAFRIRI *et al*, 1996).

Tem sido demonstrado que o bloqueio da meiose em oócitos é dependente de eventos de fosforilação catalisados pela proteína quinase A (PKA). Esta quinase, dependente de cAMP, faz parte de uma via de transdução de sinal que inclui as enzimas adeninato ciclase e fosfodiesterase. Após ser produzido, o cAMP se liga a subunidade reguladora da PKA, que pode ser de tipo I ou II (MOCHLY-ROSEN, 1995). A subunidade II, localizada nas células do *cumulus*, é encontrada próxima a substratos protéicos, os quais são rapidamente fosforilados em resposta ao aumento da concentração intracelular de cAMP (nas células do *cumulus*), induzindo a retomada da meiose. A ativação da subunidade tipo I, presente dentro do oócito, mantém a meiose inibida (DOWNS e HUNZICKER-DUNN, 1995). Portanto, a alta concentração de cAMP nas células do *cumulus* leva à GVBD, enquanto que a alta concentração de cAMP no oócito leva a ativação da PKA que fosforila proteínas específicas do oócito, mantendo-o imaturo (BILODEAU *et al*, 1993). Dekel (2005), diz ainda que a ação inibitória do cAMP não é gerada pelo oócito, mas transmitida pelas células foliculares via junções *gap*.

A retomada da meiose e sua progressão para MI dependem da ativação do MPF (fator promotor da maturação, do inglês- maturation promoting factor) pertencente à família das proteínas quinases. O MPF é um composto dimérico formado por uma subunidade catalítica, a p34cdc2, e uma subunidade reguladora, a ciclina B. Em sua forma inativa, pré- MPF, o

complexo se apresenta fosforilado nos resíduos Thr14 e Tyr 15 da subunidade catalítica (GAUTIER *et al*, 1998). O MPF é ativado pela desfosforilação desses resíduos, cuja reação é catalisada pela enzima cdc 25 fosfatase (DAI *et al*, 2000). Estudos indicam que o cAMP inibe a ativação do MPF, por prevenir a sua desfosforilação, e também reprime a síntese de ciclina B, diminuindo a quantidade disponível de pré - MPF (JOSEFSBERG *et al*, 2003). O MPF ativo, irá fosforilar as proteínas do envoltório nuclear e aquelas envolvidas com a condensação da cromatina (histonas) e reorganização do citoesqueleto (VERDE *et al*, 1992).

O padrão oscilatório de ativação do MPF em oócitos de rata maturados espontaneamente mostrou que a atividade quinase é elevada imediatamente após a retomada da meiose, antes da quebra da vesícula germinativa, e que esta atividade alcança nível máximo na (MI), declina antes da formação do primeiro corpúsculo polar e aumenta de novo antes de entrar na meiose II. (JOSEFSBERG *et al*, 2003).

A ativação do MPF é necessária para a retomada da meiose, e sua atividade elevada é requerida para progressão até MI. Josefsberg *et al* (2000), demonstrou que o declínio da atividade do MPF entre as divisões I e II da meiose, se deve ao processo de degradação da ciclina B.

As ações diretas do MPF durante a quebra da vesícula germinativa envolvem a dissolução do nucléolo, condensação cromossômica, reorganização microtubular e dissolução do envoltório nuclear. Após a GVBD, vem a MI, com a formação da placa metafásica. A primeira divisão meiótica é completada com a segregação dos cromossomos homólogos entre o oócito e o primeiro corpúsculo polar. Há a transição para a segunda divisão meiótica, onde esta é bloqueada em metáfase II (MII) até o oócito ser fertilizado. Um período de 24 horas é necessário para o oócito bovino completar sua maturação nuclear (SIRARD *et al*, 1988).

Outra quinase envolvida na maturação oocitária é pertencente à família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Estas respondem a estímulos extracelulares regulando várias atividades tais como a expressão gênica, divisão, diferenciação e sobrevivência celular (PEARSON *et al*, 2001).

Para sua ativação, as MAPKs precisam ser duplamente fosforiladas nos resíduos de tirosina e treonina (POSADA e COOPER, 1992). Oócitos de mamíferos expressam duas isoformas de MAPKs, ERK 1 e ERK2 (DEDIEU *et al*, 1996).

Os principais alvos destas enzimas são as proteínas do citoesqueleto, regulando a organização microtubular e da cromatina embora elas também possuam outros alvos citossólicos e nucleares (VERLHAC *et al*, 1993).

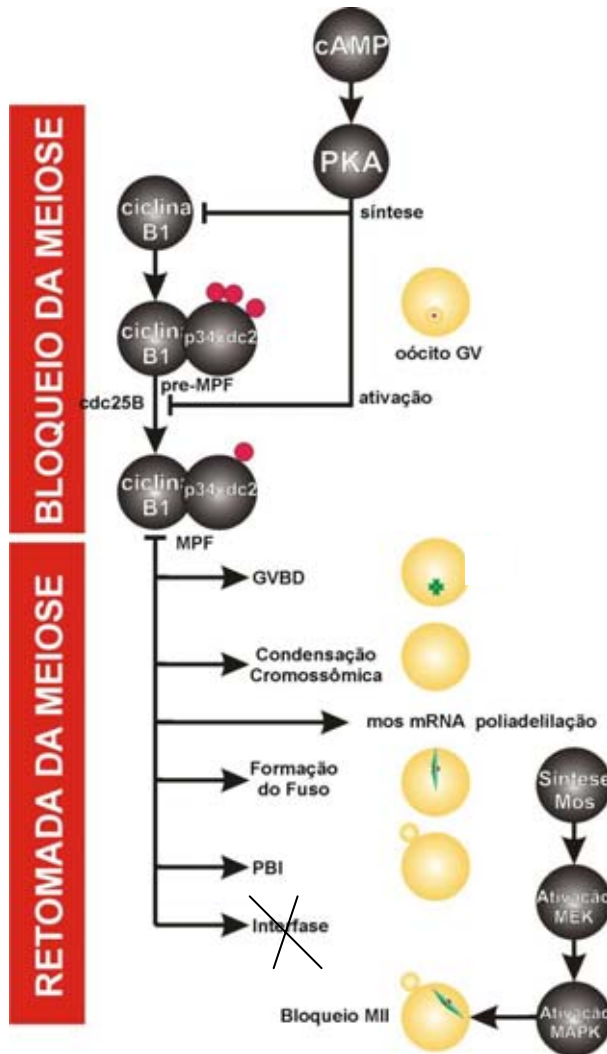
A ativação das MAPKs em bovinos, ocorre ao mesmo tempo que a ativação do MPF, pouco antes da GVBD, sendo que a atividade das MAPKs aumenta progressivamente durante as 24 horas de maturação *in vitro* (GORDO *et al*, 2001; WEHREND e MEINECKE, 2001).

Oócitos de bovinos, não necessitam de MAPKs para que ocorra a quebra da vesícula germinativa, porém, quando estas enzimas não estão presentes a meiose é reiniciada e esta não é bloqueada novamente no estágio de MII, levando à conclusão de que estas enzimas têm um papel crítico no bloqueio da meiose através de sua ação de manter alto e estável o nível de MPF neste estágio (GORDO *et al*, 2001).

O bloqueio da meiose em MII é mantido por um componente denominado fator citostático (SHIBUYA e MASSUI, 1989). Este é um produto do oncogene *mos*, que é expresso no início da maturação e desaparece imediatamente após a fertilização (WATANABE *et al*, 1989). O CSF estabiliza direta, ou indiretamente a atividade do MPF durante a MII. (SAGATA *et al*, 1989).

Foi observado, que todos os componentes da cascata *mos* – MEK –MAPK, são membros do fator citostático. O *mos* ativa a MEK (uma quinase específica da MAPK), que por sua vez ativa a MAPK (FISSORE *et al*, 1996; SAGATA, 1997). Gordo *et al* (2001) mostraram que a MAPK promove a estabilidade do MPF, e que esta também é responsável pela organização microtubular que irá fazer a configuração cromossômica correta no estágio de MII.

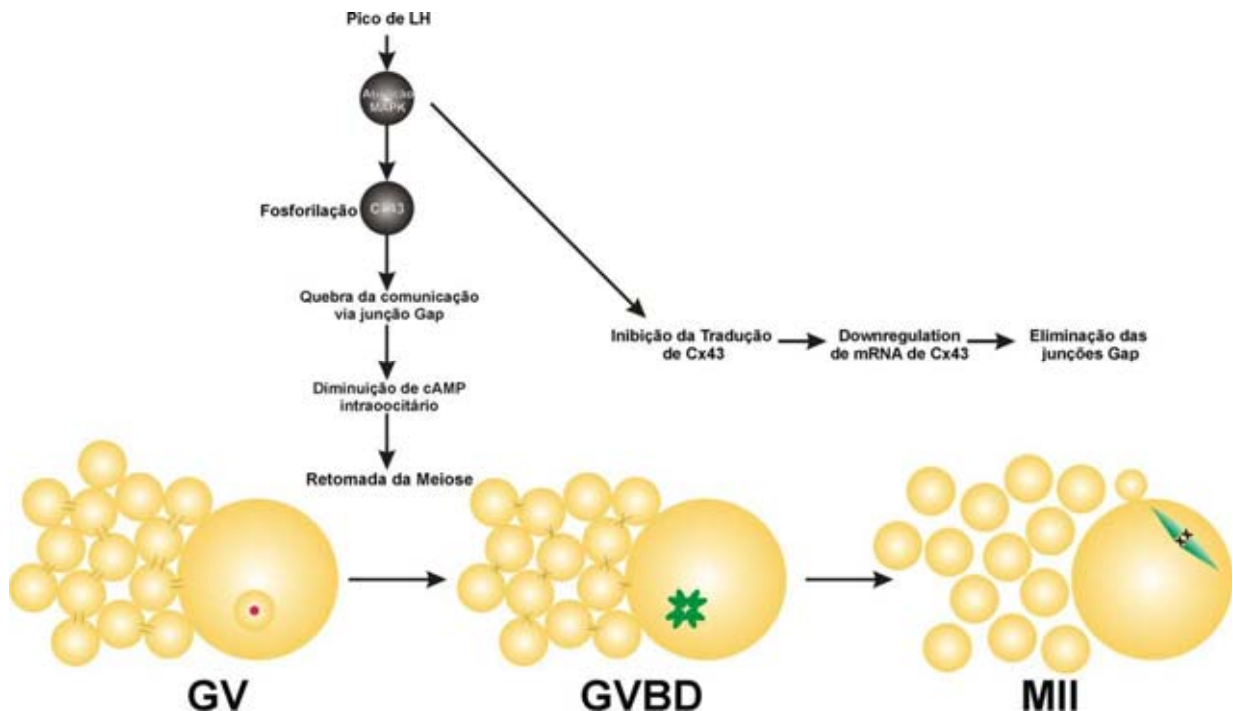
Os esquemas ilustram o que foi dito anteriormente.



Esquema 1: Mecanismo de regulação da maturação nuclear.

Material reproduzido com modificações. Adaptado de Dekel (2005).

A ação inibitória do cAMP mediada pela proteína quinase A (PKA) é conferida em dois níveis: na prevenção da ativação do pré-MPF e repressão da síntese de-novo da ciclina B1. Em resposta ao pico de LH, ou ao retirar o oócito do folículo, a concentração intracelular de cAMP diminui e a ativação do MPF é catalizada pela enzima cdc25fosfatase. A ativação do MPF induz a retomada da meiose, GVBD, condensação cromossômica e formação do fuso. O MPF também estimula a poliadenilação de mos mRNA, que leva à síntese de Mos e ativação da MAPK. A inativação do MPF em MI é necessária para que a primeira divisão da meiose seja completada e haja a extrusão do primeiro corpúsculo polar (PBI), enquanto que sua reativação impede que haja uma fase de intérfase entre as duas divisões da meiose, garantindo a transição para MII. O bloqueio em MII permanece até a fertilização pela ativação da MAPK.



Esquema 2: Regulação do diálogo entre as células do *cumulus* e o oócito.

Material reproduzido com modificações. Adaptado de Edry *et al* (2006).

A fosforilação da conexina 43 (Cx43) pela MAPK leva a diminuição da concentração intraocitária de cAMP possibilitando a retomada da meiose. A inibição da tradução de Cx43 e a “downregulation” de seu mRNA, representam a resposta tardia do pico de LH. Esta resposta que também é mediada pela MAPK e leva a eliminação das junções *Gap*.

Oócitos em desenvolvimento podem ser classificados como competentes, ou incompetentes para retomar a meiose (ARLOTTO *et al*, 1996). Competência meiótica está associada com o acúmulo de p34 no fim do desenvolvimento oocitário (DE VANTERY *et al*, 1996) e quantidade suficiente de ciclina B (LEVESQUE e SIRARD, 1996) para haver matéria-prima para o pré – MPF. O efeito da deficiência na quantidade / atividade de MAPK na aquisição de competência meiótica não são conhecidos, porém níveis inadequados desta proteína podem afetar alguns eventos de ativação oocitária o que irá gerar baixas taxas de clivagem (GORDO *et al*, 2001).

A aquisição da plena competência meiótica, também coincide com a redução da atividade transcricional de oócitos bovinos (HYTTEL *et al*, 1997) e com o diâmetro folicular e oocitário. Oócitos bovinos adquirem habilidade de retomar a meiose em folículos antrais de 2-3 mm e o diâmetro necessário para que o oócito retome a divisão celular e este seja competente para terminá-la é de 110  $\mu\text{m}$  (FAIR *et al*, 1995).



### 3.1.3. *Maturação citoplasmática*

Embora existam métodos baseados na morfologia dos oócitos para seleção de gametas competentes para a fertilização e posterior desenvolvimento embrionário, não tem sido observado o aumento nas taxas de PIVE, que continuam sendo de 30 – 40 % (DE LOOS *et al*, 1989; VAN BLERKON *et al*, 1990). Inúmeras modificações ultraestruturais e moleculares ocorrem durante a oogênese, e são altamente relacionadas com o desenvolvimento da competência oocitária (HYTTEL *et al*, 1997).

Durante seu desenvolvimento, o oócito aumenta o diâmetro de < 30 µm (folículo primordial) para mais de 120 µm (folículo terciário). Este aumento em tamanho é acompanhado por acúmulo de mRNA, proteínas, substratos e nutrientes, os quais são pré-requisitos para o oócito se tornar competente (SIRARD *et al*, 2006).

Competência oocitária, portanto, inclui todos os eventos que introduzem ao oócito próximo a ovulação, a capacidade de completar a maturação nuclear, ser fertilizado e iniciar a embriogênese para um desenvolvimento fetal normal (GANDOLFI e GANDOLFI, 2001; SIRARD *et al*, 2006).

A primeira evidência de competência citoplasmática ocorre quando o oócito pára a síntese de RNA e proteínas, por modificações na maquinaria transcricional e traducional (SIRARD *et al*, 2006). A atividade transcricional é refletida pela ultraestrutura do nucléolo, componente fibrilo-granular, que no período de crescimento oocitário exibe sua maior atividade. Quando o oócito atinge o diâmetro de 110 µm, a função do nucléolo é inativada, refletindo uma mudança ultraestrutural, que é a marginalização dos centros fibrilares. Então, o nucléolo se torna inativo, sendo ultraestruturalmente observado como uma esfera com fibrilas empacotadas (FAIR *et al*, 1996).

A segunda série de mudanças ocorre próximo ao pico de LH, que resulta na redistribuição das organelas (maturação citoplasmática) e acúmulo de moléculas específicas (maturação molecular) para preparar o oócito para os eventos pós-fertilização (SIRARD *et al*, 2006).

#### 3.1.3.1. *Modificações ultraestruturais no oócito durante a foliculogênese*

As modificações ultraestruturais que ocorrem durante o processo de maturação são de extrema importância para o oócito assegurar sua competência para o desenvolvimento. No folículo primordial, o oócito possui um núcleo central com cromatina descondensada e, geralmente, um ou dois nucléolos inativos. As mitocôndrias são dispostas centralmente e são

arredondadas. O córtex oocitário é repleto de “coated pits” (vesículas recobertas por membrana), através das quais o oócito se comunica com as células da granulosa por endocitose (HYTTEL *et al*, 1997; KACINSKIS *et al*, 2005).

No folículo primário, o oócito apresenta microvilosidades, as mitocôndrias começam a ficar alongadas e o núcleo se localiza periféricamente (HYTTEL *et al*, 1997; KACINSKIS *et al*, 2005).

No folículo secundário, o complexo de Golgi é responsável pela produção de grânulos corticais e pela deposição da zona pelúcida (ZP). Devido ao desenvolvimento da ZP, ocorre a perda da proximidade entre o oócito e as células da granulosa. Sendo assim, a comunicação intercelular deixa de ser via endocitose, e são desenvolvidas as junções *Gap*. São observados também pequenos grumos de grânulos corticais em vesículas delimitadas por membranas e o nucléolo adquire uma estrutura fibrilo-granular com atividade transcricional (CROZET *et al*, 1986, HYTTEL *et al*, 1997; KACINSKIS *et al*, 2005).

No folículo terciário inicial, as organelas se distribuem pelo ooplasma, as mitocôndrias se multiplicam, gotículas de lipídeos se tornam comuns e o tamanho e o número dos grumos de grânulos corticais e vesículas aumentam com o aumento do diâmetro do oócito. No folículo terciário tardio, as organelas se deslocam para a periferia, o número de gotículas de lipídeos e vesículas aumenta, assim como o tamanho do complexo de Golgi. O nucléolo é inativado, se tornando uma esfera de fibrilas empacotadas (FAIR, 1996; HYTTEL *et al*, 1997; KACINSKIS *et al*, 2005).

No folículo de Graaf ou dominante, a quantidade das gotículas de lipídeos e os grumos de grânulos corticais aumentam e se deslocam para uma região mais superficial (CRAN, 1989). A localização dos grânulos corticais é a mudança ultraestrutural mais aparente do processo de maturação citoplasmática. O envoltório nuclear começa a se ondular e o nucléolo se torna morfológicamente parecido a um anel (ASSEY *et al*, 1994; HYTTEL *et al*, 1997).

Após o pico de LH, há a quebra da vesícula germinativa, o oócito em MII apresenta os grânulos corticais alinhados com a membrana plasmática, as gotas de lipídeos e as mitocôndrias adquirem uma posição mais central no ooplasma, deixando uma zona periférica sem organelas, na qual a principal característica é a presença de grumos de retículo endoplasmático liso. O espaço perivitelínico se desenvolve para evitar a poliespermia, e o complexo de Golgi praticamente desaparece (ASSEY *et al*, 1994; DIEZ *et al*, 2005; HYTTEL *et al*, 1997).

Outro parâmetro morfológico que avalia a maturação citoplasmática é a expansão das células do cumulus (KRUIP *et al*, 1983).

A análise microscópica de oócitos maturados *in vitro* mostra que as células do *cumulus* se expandem, o citoplasma é morfologicamente normal, e uma grande quantidade de vesículas digestivas é observada (DIEZ *et al*, 2005). A ausência, ou o número reduzido de células do *cumulus* mostra um efeito negativo na produção de embriões (BLONDIN e SIRARD, 1995), uma vez que estas células provêm ao oócito componentes indispensáveis para o desenvolvimento de sua competência. Oócitos desnudos são capazes de alcançar o estágio de MII, mas são incapazes de sofrer os processos de fertilização e desenvolvimento normais (ZHANG *et al*, 1995).

### 3.1.4. *Maturação molecular*

Cada vez mais tem sido demonstrado que a maturação meiótica envolve mudanças importantes no compartimento citoplasmático, e que estas modificações são essenciais para a progressão adequada do processo maturacional (BREVINI *et al*, 2007). Portanto, maturação citoplasmática e nuclear devem caminhar em sincronia para haver a plena capacitação do oócito.

A maturação molecular, subdivisão da maturação citoplasmática, é a que menos se tem conhecimento, pois nem sempre esta pode ser detectada em nível ultraestrutural.

A hipótese corrente diz que maturação molecular se trata de proteínas e mRNAs específicos produzidos e adicionados ao estoque oocitário poucos dias antes da ovulação (SIRARD *et al*, 2006).

A transcrição, o estoque de mRNA e proteínas ocorre durante o crescimento folicular e cessa quando há a GVBD com a retomada da meiose, uma vez que os cromossomos tornam-se condensados e “inativos” (GANDOLFI e GANDOLFI, 2001).

Em vacas, a atividade transcricional tem início em folículos secundários iniciais, onde o hnRNA (RNA heterogêneo - precursor do mRNA) e o rRNA (RNA ribossômico) são sintetizados. Tal atividade progride até o oócito alcançar o diâmetro de 110 µm, num folículo antral com diâmetro de 2-3 mm. Após este estágio, somente uma síntese basal de hnRNA é preservada até a GVBD, quando uma diminuição intensa é observada (FAIR *et al*, 1997).

Esta atividade transcricional provê ao oócito estoque citoplasmático de moléculas mensageiras que poderão ser traduzidas posteriormente (GANDOLFI e GANDOLFI, 2001) as quais são essenciais para promover as cascatas moleculares para ativação do genoma embrionário e conseqüentemente o desenvolvimento embrionário inicial. Portanto, o oócito tem papel crítico no intervalo que vai do momento da fertilização até a chamada transição

materno-zigótica, que é o momento em que o embrião deixa de depender dos estoques maternos de mRNAs e proteínas. Em bovinos esta transição ocorre em embriões no estágio de 8-16 células (TELFORD *et al*, 1990).

A retomada da meiose e o processo de maturação nuclear são controlados por proteínas quinases e fosfatases, as quais modulam as vias celulares por eventos de fosforilação e desfosforilação, sendo estes eventos necessários para que haja a GVBD (KASTROP *et al*, 1990; SIRARD *et al*, 1989). Portanto, a síntese protéica é requerida para que o oócito retome a divisão celular. Esta síntese, aparentemente também é necessária em outros 3 pontos da maturação nuclear:

- Para progressão ao estágio de MI;
- Para o oócito completar a meiose I e chegar até MII;
- Para a manutenção da configuração cromossômica em MII, evitando configurações anormais (SIRARD *et al*, 1989).

Estudo demonstra que a síntese protéica é máxima nas 12 primeiras horas da maturação, período crítico para a GVBD e progressão para MI, e que esta síntese cai significativamente em oócitos maduros, com 40-44 h de maturação. Também é observado que poucas modificações ocorrem com relação aos tipos de proteínas sintetizadas pelo oócito nas primeiras 24 horas de maturação, com exceção de uma proteína com peso de 39-kDa, que mostrou um aumento significativo no período de 16-24 h de maturação *in vitro*, sendo esta relacionada com altas taxas de maturação nuclear. (WU *et al*, 1996).

Modificações pós-traducionais também estão envolvidas nas modificações nucleares que regem os eventos do ciclo celular, ou seja, a maturação oocitária. A fosforilação protéica é um método de regulação pós-traducional, então substâncias que são capazes de regular a fosforilação protéica podem inibir a GVBD (SIRARD *et al*, 1988).

De acordo com estas informações, torna-se claro que o oócito requer a transcrição de RNA durante seu desenvolvimento, isto para que haja a tradução de proteínas que irão comandar o processo de maturação, assim como de proteínas estruturais, para que ele atinja seu diâmetro máximo.

Estudos mostram que a síntese de RNA é alta no período de desenvolvimento oocitário até o oócito atingir o diâmetro de 3 mm. Com o aumento do tamanho folicular, esta síntese cai, acompanhada por uma mudança da ultra estrutura nucleolar. (CROZET *et al*, 1986, FAIR *et al*, 1995).

Oócitos com diâmetro < 100  $\mu$ m são incapazes de transcrever, traduzir mRNA, ou de executar procedimentos pós-traducionais necessários para a síntese e ativação de proteínas

requeridas para a GVBD. A plena capacidade de transcrição, tradução e modificações pós-traducionais requeridas para que a maturação *in vitro* seja completa, são conseguidas em oócitos com diâmetro mínimo de 110  $\mu\text{m}$ .

A maior parte do RNA transcrito até o oócito atingir o estágio de MII, persiste no ooplasma de uma forma estável, mas traducionalmente inativa (VAN BLERKOM, 1991). Isto por que as moléculas de RNA acumuladas no citoplasma oocitário durante sua fase de desenvolvimento serão utilizadas para sustentar as fases iniciais do desenvolvimento embrionário, fazendo do oócito, uma célula especial, diferente das células somáticas em que o processo de renovação de estoque destas moléculas é contínuo. Por este motivo, uma série de estratégias para o estoque de formas quiescentes e seu uso no momento da maturação, ou desenvolvimento embrionário foi desenvolvida (GANFOLFI e GANDOLFI, 2001).

Dentre os mecanismos de regulação, é bem aceito que mRNAs que contém uma cauda poli (A) pequena, são traducionalmente inativos, devido a sua baixa estabilidade. Estes são ativados pelo aumento da cauda a medida que ocorre o desenvolvimento do oócito. (RICHTER, 1996 *apud* GANFOLFI e GANDOLFI, 2001).

De acordo com Brevini-Gandolfi *et al* (1999), mRNAs estocados em citoplasmas de oócitos que não adquiriram a plena competência para o desenvolvimento possuem a cauda poli (A) menor do que aqueles encontrados em oócitos competentes. Esta diferença pode ser observada pelo estágio de maturação nuclear nos quais os oócitos se encontram em GV e MII, respectivamente. Estes dados relacionam o tamanho curto da cauda poli (A), com a baixa competência para o desenvolvimento (LEQUARRE *et al*, 2004).

Uma fina regulação da expressão gênica é responsável pelas corretas modificações que ocorrem durante a maturação e desenvolvimento oocitários. Estes processos parecem estar sob controle de mecanismos pós-transcricionais, guiados por componentes citoplasmáticos, que são sintetizados durante a oogênese e estocados no oócito até serem ativados em estágios específicos do desenvolvimento. Estas observações sugerem que a competência para o desenvolvimento depende de uma correta regulação de diferentes componentes que interagem no compartimento citoplasmático, responsáveis pela determinação do destino do oócito (GANFOLFI e GANDOLFI, 2001).

### 3.2. Mecanismos de inibição da retomada da meiose

Como observado por Pincus e Enzmann (1935), quando o oócito é retirado do ambiente folicular, ocorre a retomada da divisão nuclear. Tal fato resulta na condensação cromossômica, levando ao bloqueio da atividade transcricional e é acompanhado por profundas modificações no padrão de síntese protéica, que leva a modificações importantes do padrão de maturação citoplasmática (DE SOUZA *et al*, 1998; LONERGAN *et al*, 1994; WU *et al*, 1996). Observa-se então, uma perda na sincronia entre maturação citoplasmática e nuclear, o que influencia negativamente a aquisição de competência oocitária.

Para tentar resolver este problema, várias modificações nas condições de maturação utilizadas atualmente têm sido propostas, tais como o estabelecimento de dois passos de cultivo incluindo uma pré-maturação na presença de um inibidor sintético de maturação nuclear, ou co-cultivo com células, ou tecidos foliculares (FRANZ *et al*, 2002; LE BEAUX *et al*, 2003; MACHALKOVA *et al*, 2004; SIRARD *et al*, 1993; 1992).

A inibição da retomada da meiose tem sido sugerida como meio através do qual os oócitos adquirem um tempo adicional para sofrer as modificações necessárias para aquisição de competência (LONERGAN *et al*, 2000). Portanto, este tempo adicional possibilitaria uma melhor sincronização entre os processos de maturação nuclear e citoplasmática com objetivo de maximizar a produção de embriões (FRANZ *et al*, 2002; LE BEAUX *et al*, 2003; MACHALKOVA *et al*, 2004; SIRARD *et al*, 1993; 1992). Para este fim, e para o estudo dos pontos de controle do processo maturacional, inibidores farmacológicos e fisiológicos da maturação nuclear têm sido amplamente testados. (LE BEAUX *et al*, 2003).

#### 3.2.1. Inibidores de transcrição

Embora seja pequeno o nível de atividade transcricional que o oócito mantém após estar plenamente desenvolvido, este pode ser necessário para ativação de genes relacionados a aquisição de competência, bem como de genes que sinalizam para a retomada da meiose. O cultivo de COCs bovinos na presença de inibidores de transcrição, pode levar a inibição da síntese de mRNAs necessários para estas importantes funções fisiológicas (RODRIGUEZ e FARIN, 2004). Para o estudo da importância da síntese de mRNA durante a maturação de oócitos bovinos, tem sido adicionado ao meio de maturação, inibidores da enzima RNA polimerase II, como  $\alpha$ -amanitin e 5,6-dicloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB).

A  $\alpha$ -amanitin, composto isolado do cogumelo *Amanita phalloides*, é um inibidor de transcrição que se liga irreversivelmente à enzima RNA polimerase II (WIT e KRUIP, 2001).

A adição deste inibidor no início do cultivo reduz a taxa de GVBD em COCs para 75% (TATEMOTO e TERADA,1995). No entanto, foi demonstrado que este composto não exerce seu efeito na quebra da vesícula germinativa de oócitos desnudos, nem na ausência de FSH (KASTROP *et al*, 1991b; TATEMOTO e TERADA,1995; WIT e KRUIP, 2001). A explicação fisiológica para o primeiro fato, é que o seu sinal é transmitido via junções *Gap*, das células do *cumulus* para o oócito e como seu efeito é cumulativo, a sensibilidade dos COCs a este inibidor é determinada pelo número de células do *cumulus* que cercam o oócito. A sensibilidade dos COCs à  $\alpha$ -amanitin também diminui com o aumento da atresia, uma vez que as células do *cumulus* vão perdendo a comunicação que mantinham a medida que o nível de atresia aumenta (WIT e KRUIP, 2001). Já a necessidade da gonadotrofina para a inibição da maturação nuclear mediada pela  $\alpha$ -amanitin, se deve ao fato que o FSH gera um pico de cAMP intraocitário (DOWNS *et al*, 1989), que sozinho, não é suficiente para manter o oócito em vesícula germinativa, mas se unindo ao efeito da  $\alpha$ -amanitin leva ao bloqueio da retomada da meiose (WIT e KRUIP, 2001).

A meiose bloqueada pela  $\alpha$ -amanitin é parcialmente reversível após a retirada do inibidor do meio de cultivo (MEINECKE e MEINECKE-TILLMAN, 1993), e o desenvolvimento embrionário posterior não acontece, mostrando a necessidade da síntese de mRNA para o oócito adquirir competência (WIT e KRUIP, 2001). Altas taxas de degeneração oocitária também são encontradas após cultivo com  $\alpha$ -amanitin (HUNTER e MOOR, 1987).

O DRB, é utilizado para manter a meiose bloqueada em oócitos bovinos, de maneira específica e reversível. O tratamento com DRB diminui a transcrição de RNA total para apenas 57%, e bloqueia a transcrição de mRNA em aproximadamente 90%, sem demonstrar efeito na síntese protéica (FARIN e YANG, 1994). Quando adicionado ao meio de maturação a intervalos de 4 horas por um período de 20 horas, é capaz de manter 80% dos oócitos em GV e após cultivo em meio sem DRB, aproximadamente 96% dos oócitos têm a meiose retomada e alcançaram MII (RODRIGUEZ e FARIN, 2004). Matus e Farin (1994), no entanto, concluíram que o resultado da adição de DRB ao meio em intervalos de 8 horas no bloqueio da meiose não é estatisticamente diferente de quando este é adicionado em intervalos de 3 horas, 61 e 72% de vesícula germinativa respectivamente.

A inibição da GVBD mediada pelo DRB, é claramente mais efetiva na presença de suplementação com gonadotrofinas (LH/FSH), talvez pelo fato de que as gonadotrofinas inibam um pouco a atividade transcricional, tornando o oócito mais sensível ao DRB. Foi observado também que a inibição da atividade transcricional é acompanhada por inibição da

expansão das células do *cumulus*, e que a habilidade do DRB manter os oócitos em GV é completamente dependente da presença destas células (FARIN e YANG, 1994).

Rodriguez e Farin (2004), mostram que a inibição da transcrição com DRB durante o período de maturação, não compromete a subsequente progressão para MII, ou o desenvolvimento de blastocistos, representando um modelo de estudo para identificação fatores que regulam o início da quebra da vesícula germinativa.

### 3.2.2. Inibidores de síntese proteica

Wu *et al* (1996) concluíram que uma quantidade significativa de proteínas é sintetizada nas primeiras horas da maturação, com um pico de produção entre 8 e 12h, sendo estas essenciais para que ocorra a retomada da meiose. Portanto, inibidores de tradução, ou de síntese proteica, são considerados os mais potentes inibidores da maturação espontânea de oócitos bovinos (FULKA *et al*, 1986; TATEMOTO *et al*, 1994).

Ciclohexamida é uma tetraciclina, que inibe a síntese proteica por reter a proteína na subunidade 80S do ribossomo, interferindo com a enzima peptidil transferase (VASQUEZ, 1974 *apud* SIRARD *et al*, 1998).

O tratamento de COCs com ciclohexamida é capaz de prevenir a condensação cromossômica em 80-90% dos oócitos, no entanto, quando se trata de oócitos desnudos, foi observada uma alta taxa de condensação cromossômica (40-57%), mostrando que além da síntese proteica ser um pré-requisito para a GVBD, as células do *cumulus* também são responsáveis por esta regulação (TATEMOTO *et al*, 1994).

A síntese de proteínas nas células do *cumulus*, ao contrário dos oócitos, continua constante até 44 h de maturação, porém, existe uma considerável diferença entre as proteínas sintetizadas pelas células foliculares e as sintetizadas pelo oócito, que é refletido pelas diferentes funções, metabolismo e morfologia dos dois tipos celulares. Para que ocorra a maturação oocitária, o próprio oócito sintetiza as proteínas específicas que irão regular a progressão do evento, enquanto que as proteínas sintetizadas pelas células do *cumulus* irão estimular, ou modular este processo (WU *et al*, 1996).

A adição de ciclohexamida 6,7 e 8 h depois do início da cultura resultou em 27, 74 e 87% de retomada da meiose, respectivamente, corroborando com o fato de que a síntese de novas proteínas é necessária para que haja a GVBD. A adição do inibidor após 11 h do início do cultivo, no entanto, permitiu a GVBD, porém, apenas 13% dos oócitos chegaram ao estágio de MI, indicando que a síntese proteica contínua é requerida para a progressão da maturação (TATEMOTO e TERADA, 1995).



O efeito inibitório da ciclohexamida é reversível. O cultivo dos COCs em meio sem inibidor gera uma taxa de aproximadamente 80% de MII, sendo que a cinética da maturação nuclear em oócitos pré-cultivados com ciclohexamida é duas vezes mais rápida que em ovócitos não tratados (TATEMOTO *et al*, 1994).

Oócitos tratados com ciclohexamida por um período maior que 12 horas têm uma diminuição na taxa de produção de blastocistos. (LONERGAN *et al*, 1997).

### 3.2.3. Inibidores de atividade quinase

A ativação do MPF é o ponto chave da retomada da meiose em oócitos bovinos. Sabendo que esta ativação envolve eventos de desfosforilação dos resíduos de treonina e tirosina da subunidade catalítica (p34) (DAI *et al*, 2000; GAUTIER *et al*, 1998), conclui-se que tal atividade requer tanto síntese proteica, quanto eventos em cascata de desfosforilação/fosforilação. Portanto, a prevenção da atividade do MPF nestes dois pontos de controle, leva ao bloqueio da progressão da meiose (LONERGAN *et al*, 1997).

Estudos com derivados de purinas, especificamente direcionados para inibição da atividade do MPF, têm sido determinados e utilizados de forma bem sucedida para prevenir a meiose em pequenos organismos. Dentre estes inibidores, a roscovitina e o butirolactona, possuem o mesmo mecanismo de ação, que é a competição por sítios de ligação de ATP, impedindo a ligação do ATP necessária para as atividades de fosforilação, o que impede a ativação do MPF (MEIJER, 1996).

Mermillod *et al* (2000), avaliaram pela primeira vez a utilização de roscovitina em oócitos de bovinos, e seus resultados mostram que este inibidor foi capaz de manter aproximadamente 80% dos oócitos em GVBD por 24 h de cultivo, quando utilizado em doses de 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ , sendo que este efeito inibitório foi revertido em 89% dos oócitos pré-maturados na presença de roscovitina e maturados na presença de fator de crescimento epidermal (EGF). Nenhuma diferença significativa foi observada com relação a taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto entre os COCs maturados diretamente, ou submetidos ao tratamento com roscovitina para o bloqueio da meiose.

Altas doses de roscovitina também são capazes de inibir a atividade de MAPKs, como a erk 1 e erk 2 (MEIJER *et al*, 1997). Este fato pode explicar porque uma pequena dose de roscovitina, 12,5  $\mu\text{M}$ , permite a quebra da vesícula germinativa, mas os oócitos que retomam a meiose não ultrapassam o estágio de MI (MERMILLOD *et al*, 2000).

Foi observado que oócitos cultivados na presença de roscovitina têm o padrão de síntese protéica mantida e que esta pré-maturação também impede a queda da quantidade de mRNA de ciclina B1 e CDK1 (ciclina dependente de quinase), o que geralmente ocorre durante o processo de maturação *in vitro* (VIGNERON *et al*, 2004)

A pré-maturação com butirolactona, impede a ativação do MPF e da MAPK de maneira reversível. Após 24 h de cultivo na presença de 100  $\mu\text{M}$  deste inibidor, 100% dos oócitos permaneceram em GV, apresentando, após 24 h de maturação em condições padronizadas, 95% de MII (ADONA *et al*, 2007a).

Adona *et al* (2007b), testaram várias concentrações para o bloqueio da meiose com butirolactona, e perceberam que seu efeito é dose-dependente, varia de 65 – 97% de GV para doses de 25 – 100  $\mu\text{M}$  do inibidor, quando o cultivo é feito na presença de albumina sérica bovina (BSA) ou soro. No entanto, se este for realizado em condições definidas, concentrações de 25 – 10  $\mu\text{M}$  são igualmente efetivas no bloqueio da meiose, gerando 95 – 99% de GV. Também foi observado que a dinâmica microtubular não foi afetada durante a MIV, fato de extrema importância, uma vez que o citoesqueleto é responsável não só pela translocação de organelas dentro da célula, mas também de mRNAs e proteínas envolvidas, ou não com o ciclo celular, para locais específicos (ADONA *et al*, 2007b; BREVINI *et al*, 2007).

A pré-maturação com butirolactona não mostrou diferenças significativas em relação ao grupo controle, com relação às taxas de clivagem e produção de blastocistos (ADONA *et al*, 2007b).

O tratamento associado de pequenas doses de butirolactona e roscovitina é menos efetivo no bloqueio da GVBD, cerca de 89% dos oócitos cultivados neste sistema apresentaram-se em GV após 24 h de cultivo (ADONA *et al*, 2007a).

A cinética da maturação em oócitos pré-maturados com pequenas doses de roscovitina associada com butirolactona é acelerada, em comparação ao grupo controle, ou seja, com o grupo que não passou pelo tratamento de pré-maturação. A razão para esta aceleração, pode ser devida ao fato que durante o bloqueio meiótico, o oócito acumula fatores relacionados à progressão do ciclo celular, e que nem todos os eventos relativos à maturação são bloqueados (ADONA *et al*, 2007a; VIGNERON *et al*, 2004).

Outro inibidor de atividade quinase é o N-6 dimetilaminopurina (6-DMAP), análogo do antibiótico puromicina. Este inibe a desfosforilação dos resíduos de tirosina do MPF, mantendo-o inativo, pouco antes da GVBD (JESSUS *et al*, 1991).

Sem apresentar nenhum efeito na síntese protéica, o 6-DMAP é capaz de inibir reversivelmente a GVBD (DODE e ADONA, 2001; NEÁNT e GERRIER, 1988). No entanto, oócitos bovinos só permanecem com a meiose bloqueada se forem tratados nas primeiras 4 horas de cultivo (FULKA *et al*, 1991).

Apesar de não alterar a taxa de oócitos maturados e a taxa de clivagem, após o tratamento com 6-DMAP, a taxa de produção de blastocistos cai consideravelmente em relação ao controle -15,2 - 26,1% respectivamente (DODE e ADONA, 2001). Alguns autores sugerem que este inibidor apresenta efeito tóxico que pode levar a aberrações cromossômicas (SIMILI *et al*, 1997). Cerca de 60-80% dos oócitos pré-maturados na presença de 6-DMAP apresentam placa metafásica anormal em relação ao controle (AVERY *et al*, 1998).

#### 3.2.4. Inibidores fisiológicos

Pincus e Enzman (1935), observaram pela primeira vez que ao ser retirado do ambiente folicular o oócito reinicia a meiose, chegando à conclusão que existem fatores foliculares que atingem o oócito e inibem a retomada da maturação nuclear. Por este motivo e para que haja o pleno entendimento do diálogo entre as células somáticas do folículo ovariano e o oócito, além da tentativa de se produzir um sistema de cultivo *in vitro* que mimetiza o ambiente folicular, vários pesquisadores têm estudado o efeito do co-cultivo de porções da parede folicular (HS), células da teca, células da granulosa, e do fluido folicular na maturação do oocitária.

A utilização de fluido folicular (FF) no meio de maturação tem o objetivo de melhorar as condições de MIV, devido ao fato deste ser o meio natural onde ocorrem os processos maturacionais *in vivo*, além deste ser responsável pela nutrição do oócito durante sua fase de crescimento e ainda possuir fatores que inibem a maturação oocitária (SIRARD e FIRST, 1988).

O efeito do fluido folicular na maturação oocitária, no entanto, depende do tamanho do folículo do qual foi retirado (ALI *et al*, 2004; LONERGAN *et al*, 1994), do estágio do ciclo estral (SIRARD *et al*, 1995) e da quantidade de fluido utilizada (ALI *et al*, 2004).

Fluido folicular derivado de folículos grandes possui menor poder inibitório do que FF derivado de folículos pequenos e médios (AYOUB e HUNTER, 1993; DOSTAL e PAVLOK, 1996) além de que este possui um efeito dose-dependente na inibição da meiose (SIRARD *et al*, 1992).

Fatores isolados do FF demonstram um efeito parcial sobre a inibição da meiose de oócitos bovinos. O inibidor da maturação do oócito (OMI- do inglês oocyte maturation

inibitor) é um fator isolado do fluido folicular de porcas (SIRARD *et al*, 1998). Estudos demonstram que a presença de fluido folicular no meio de maturação reduz a taxa de GVBD nas primeiras 6 horas de cultivo para 22 – 56% em comparação ao controle – 74%, mas após 21 horas de cultivo, cerca de 91% dos oócitos retomam a meiose mesmo na presença do FF (SIRARD *et al*, 1992; SIRARD e FIRST, 1988). De acordo com Coleman *et al* (2007) após 24 horas de cultivo na presença de 100% de FF, 1,9% dos oócitos estavam em vesícula germinativa, mas apenas 44,5% destes alcançaram os estágio de telófase I ou metáfase II, indicando, que este efeito inibitório é associado com a finalização, e não com a retomada da meiose.

Ali *et al* (2004), conclui que a presença de fluido folicular de folículos competentes como fonte proteica no meio de maturação em um sistema de cultivo suplementado com estradiol e r-hFSH (FSH recombinante humano), aumenta a taxa de produção de blastocistos e melhora a qualidade dos embriões a níveis próximos à produção *in vivo* de embriões. É sugerido que o FF derivado de folículos grandes contém algumas proteínas responsáveis por melhorar a competência oocitária, fazendo com que haja um aumento na taxa de produção embrionária (ITO *et al*, 2007).

A utilização de células foliculares e até mesmo de hemi-seções de folículos no meio de maturação, tenta reconstituir *in vitro* o ambiente folicular com intuito de entender como os mecanismos de retomada da meiose, já que os eventos de maturação espontânea e luteinização das células da granulosa ocorrem com a retirada do oócito do ambiente folicular.

Tais eventos ocorrem pela perda da comunicação oócito-células da granulosa, realizada via junções *Gap* (LANUZA *et al*, 1998; TSAFRIRI e POMERANTZ, 1984). Cada junção *gap* é um canal composto por 6 subunidades chamadas conexinas, as quais são arranjadas de maneira a formar um poro central (UNGER *et al*, 1999), que permite a transferência de metabólitos tais como nucleotídeos, aminoácidos, açúcares e sinais que regulam a maturação meiótica (EPPIG, 1991). Cheryl *et al* (2001), demonstraram que na ausência da conexina CX43, a foliculogênese é interrompida antes dos folículos se tornarem multilaminares, causando graves conseqüências para o desenvolvimento dos oócitos. Quando a rede de comunicação oócito-CG, via junções *Gap* é desconectada através da retirada do oócito do ambiente folicular, ocorre a retomada da meiose e luteinização das células da granulosa. (DE SOUZA *et al*, 1998; LONERGAN *et al*, 1994). Estes resultados sugerem que a comunicação oócito- células foliculares está altamente correlacionada com o controle da maturação nuclear.

Foote e Thibault (1969) citado por Sirard *et al* (1992), desenvolveram pela primeira vez a co-cultura de hemi-seções foliculares e oócitos para a análise do estágio de maturação nuclear, e concluíram que o contato entre as células da granulosa e as células do *cumulus* é essencial para a manutenção da GV e prevenção da expansão do *cumulus*. No entanto, Sirard *et al* (1992) contradizem esta idéia, concluindo que a ação inibitória das hemi-seções foliculares na GVBD é diretamente relacionada com a quantidade de tecido presente na co-cultura e não com o contato físico direto entre o oócito e a parede folicular. O co-cultivo de uma HS em 50  $\mu$ L de meio de cultivo leva a uma taxa de inibição da GVBD de aproximadamente 50%, enquanto que o co-cultivo de cinco HS no mesmo volume de meio leva a 70% de inibição da GVBD. Portanto, a diferença entre os resultados encontrados pode ser devida ao fato de que o volume de meio de cultura do primeiro experimento não permitiu o acúmulo de quantidade suficiente do inibidor, concluindo que o efeito inibitório da parede folicular é dose dependente, assim como o potencial de reversibilidade do bloqueio meiótico.

Para determinar qual o elemento da parede folicular tem o poder inibitório e se este efeito é mediado via células do *cumulus*, Richard e Sirard (1996), cultivaram COCs e oócitos desnudos na presença de células da teca (CT) e células da granulosa (CG) separadamente. Os resultados demonstram que as células da teca mantém cerca de 66% dos oócitos em GV, enquanto que as células da granulosa não foram efetivas no bloqueio da maturação, apenas 10% dos oócitos cultivados na presença destas permaneceram em GV. Quando oócitos desnudos foram co-cultivados com células da teca, apenas 3 % destes tiveram a meiose inibida, demonstrando que o fator inibidor é produzido pelas CT e atuam através das células do *cumulus*. No entanto, quando o oócito é cultivado na presença de uma alta concentração de células da granulosa, 10-100 milhões/ mL, a meiose é inibida (SIRARD e BILODEAU, 1990). Sirard *et al* (1992) ainda concluem que o efeito inibitório das CG é amplificado pela presença de fluido folicular no cultivo.

Se tanto células da granulosa quanto células da teca possuem a capacidade de bloqueio da meiose *in vivo*, é possível que as CG percam o potencial de inibição da GVBD mais facilmente devido ao fato de possuírem uma maior capacidade de diferenciação ou luteinização *in vitro* quando cultivadas na presença de soro (SKINNER e OSTEEEN, 1988).

Quando COCs são cultivados na presença de monocamada de células da teca e células da granulosa oriundas de folículos grandes ao mesmo tempo, a presença das CG na cultura é capaz de anular o efeito inibitório das CT, no entanto, quando este co-cultivo é feito na presença de um ativador da proteína quinase A (PKA), o efeito inibitório das células da teca não é anulado pelas células da granulosa, levando a uma taxa de 53,4% de GV, mostrando que

a ativação da PKA nas CG leva ao bloqueio meiótico por não reverter a inibição causada pelas CT. Giometti *et al* (2005), observaram que a presença de angiotensina II ( $10^{-11}$  M) foi responsável por anular o efeito inibitório das células da teca quando estas foram cultivadas com oócitos bovinos, no entanto, quando o cultivo ocorre na ausência de células foliculares, a angiotensina II não exerce nenhuma influência.

Cultivos heterólogos têm sido realizados para saber se o efeito inibitório das células foliculares sobre a maturação é espécie-específico. Tem sido demonstrado que fatores inibitórios produzidos por células da granulosa de folículos de porca são ativos na inibição da meiose de oócitos bovinos de maneira reversível (KALOVS *et al*, 1993).

No entanto, existe uma hipótese que propõe que a meiose é reiniciada após a produção de fatores estimulatórios pelas células foliculares. Sirotkin *et al* (1998) mostra que o co-cultivo de COCs bovinos com hemi-seções foliculares de folículos de porca aumenta significativamente a taxa de oócitos maturados, indicando que as células foliculares secretam um fator promotor da maturação que não é espécie-específico. Foi demonstrado ainda que uma grande quantidade de IGF-I é produzida pelas células foliculares de porcos e bovinos e estas atuam de modo a estimular a maturação nuclear.

É muito provável que o folículo ovariano utilize reguladores tanto inibitório, quanto estimulatórios para garantir que no momento da ovulação o oócito esteja no estágio de maturação correto para ser fertilizado (SIRARD *et al*, 1998).

### 3.3. Esteroidogênese folicular

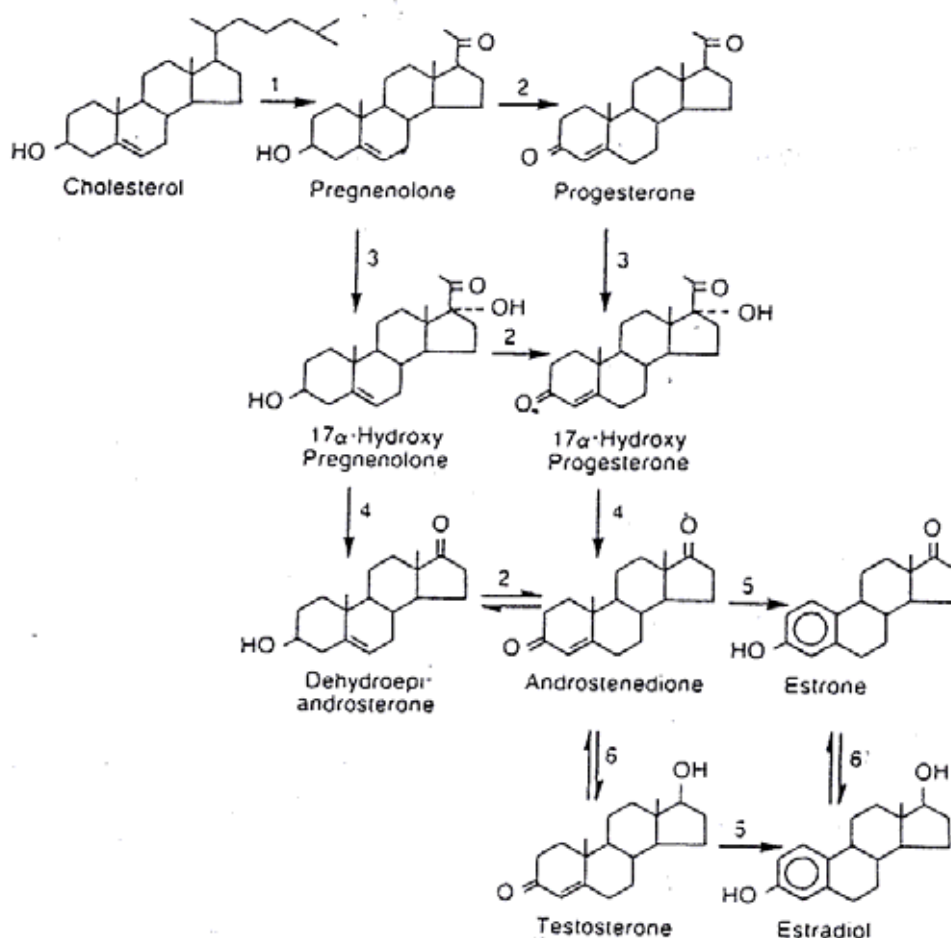
Esteroidogênese refere-se ao processo pelo qual células especializadas sintetizam os hormônios esteróides (STOCCO,2001) a partir de um precursor comum, o colesterol, sendo a disponibilidade deste determinante para a produção hormonal.

A conversão do colesterol a um hormônio esteróide é realizada pelas enzimas Star (proteína de regulação aguda da esteroidogênese), P450 side chain cleavage (P450scc), 17 $\alpha$  hidroxilase (P450c17), P450 aromatase (P450arom) e pelos esteróides óxido redutases, dentre os quais estão a 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (3 $\beta$ -HSD) e 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (17 $\beta$ -HSD).

Estas enzimas são então expressas nas células foliculares diferenciadas (células da teca e células da granulosa) de acordo com o estágio do ciclo estral em que o animal se encontra (HANUKOGLU,1992).

A esteroidogênese folicular é iniciada com o transporte do colesterol através da enzima Star para a membrana interna da mitocôndria onde é convertido a pregnenolona, o primeiro esteróide produzido na via, pela enzima P450scc (STOCCO, 2001).

Em ruminantes, a principal via é a  $\Delta^5$ , onde a pregnenolona é metabolizada até dehidroepiandrosterona pela enzima P450c17, e então em androstenediona pela 3 $\beta$ -HSD nas células da teca (SIMARD, 1995). A androstenediona migra para as células da granulosa, onde é aromatizada em estrona pela enzima P450 arom e depois convertida em estradiol pela enzima 17 $\beta$ -HSD (ROBERT *et al*, 1994). O esquema 3 mostra a esteroidogênese desde o colesterol, até o estradiol.



Esquema 3: Esteroidogênese. Esquema reproduzido de Williams e Larsen, (2003).

Esse processo é também conhecido como modelo duas células-dois hormônios porque são necessários dois tipos celulares, células da teca e células da granulosa, para que todo o processo seja realizado. Isto, devido ao fato de nenhum dos dois tipos celulares possuírem todo o aparato enzimático para a produção das três classes de esteróides, progestágenos, andrógenos e estrógenos, sendo que uma complementa a outra (SAHMI *et al*, 2004).

O folículo ovariano produz, através das células da teca e granulosa, hormônios esteróides, cuja concentração e atividade biológica variam de acordo com o estágio de desenvolvimento folicular e fase do ciclo estral no qual se encontram. (GREENWALD e ROY, 1994).

Os folículos pré-ovulatórios de bovinos, no início do estro, porém antes do pico de LH, são caracterizados por alta concentração de estradiol e baixa de progesterona e andrógenos. Até 6 horas após o pico de LH, a concentração de estrógenos permanece constante, enquanto que a secreção de progesterona e andrógenos sofrem um leve aumento.

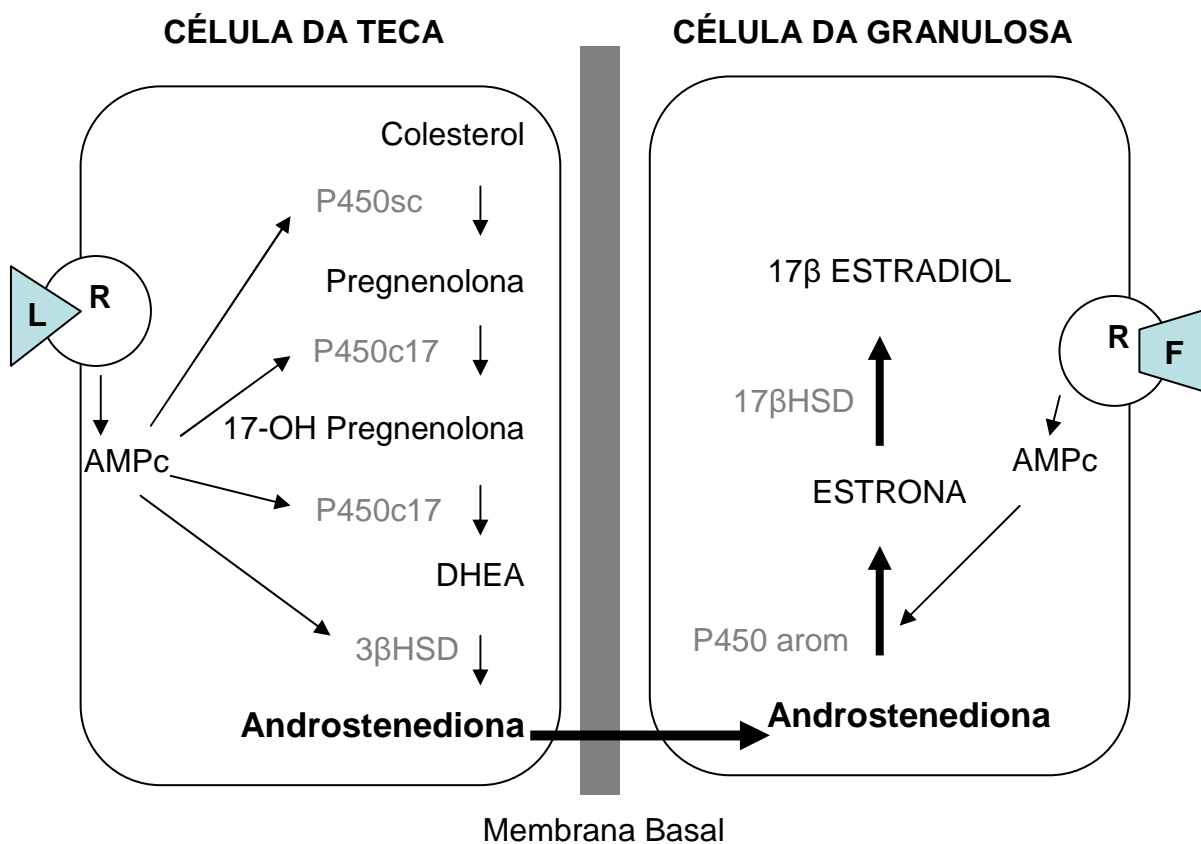


No período de 6 a 10 horas após o pico, o nível de estradiol cai bruscamente. O nível de progesterona e andrógenos também caem até chegar à concentração observada antes do pico. Após 20 horas do pico de LH, o nível de estradiol diminui mais ainda, enquanto que a concentração de progesterona aumenta muito, chegando ao nível máximo observado e constituindo cerca de 90% do conteúdo esteróide intrafolicular (DIELEMAN *et al*, 1983).

O conceito clássico da regulação ovariana, no entanto, tem sido expandido, incluindo um sistema complexo que envolve regulação parácrina e autócrina de fatores de crescimento. Dentre esses, encontra-se o IGF-I (fator de crescimento semelhante a insulina), entre outros (REED e JAMES, 1989).

O IGF-I atua como amplificador da ação do FSH no ovário, regulando os processos de diferenciação e proliferação celular, esteroidogênese e maturação (LORENZO *et al*, 1997; MONGET *et al*, 2002; SAKAGUCHI *et al*, 2002).

Do ponto de vista funcional, interações entre fatores de crescimento e os COCs pode resultar em mudanças na produção de esteróides pelas células foliculares e, assim, indiretamente afetar a maturação *in vitro* (LORENZO *et al*, 1997).



Esquema 4: Modelo duas células - duas gonadotrofinas. Material reproduzido com modificações. Adaptado de Ojeda, (1996). (L – LH; F – FSH; R – Receptor).

### 3.4. Sistemas de cultura definidos e indefinidos

As células foliculares possuem um importante papel fisiológico na formação dos folículos ovarianos, bem como na maturação do oócito. Antes de a ovulação acontecer, as células da granulosa dos folículos pré-antrais e folículos antrais pequenos sofrem um intenso período de proliferação e diferenciação e subsequente mudança na secreção hormonal (RICHARDS, 1979).

Estes eventos são finamente regulados por ações autócrinas, parácrinas e endócrinas. Os mecanismos endócrinos do desenvolvimento folicular já estão bem estabelecidos, no entanto, as ações que envolvem regulação intraovariana necessitam ainda de muito estudo.

Este tipo de investigação é feito, principalmente, através de cultivos *in vitro* de células foliculares, devido ao alto custo dos estudos *in vivo* e também por causa de limitações metodológicas. Por este motivo, as descobertas nesta área somente devem ser consideradas relevantes se as características morfológicas, bioquímicas e moleculares das células cultivadas forem mantidas durante a cultura (CAMPBELL *et al*, 1996; ROBERTS *et al*, 1994).

Modelos de cultura de células da granulosa têm sido amplamente descritos, onde os autores sempre utilizam soro em sua constituição. O papel do soro é interessante até certo ponto. Ele promove a proliferação celular, é rico em hormônios, lipídeos, sais minerais, fatores de crescimento, sendo por isto amplamente utilizado. No entanto, o soro possui fatores cuja natureza e quantidade desconhecidas, o que afeta a fidelidade da atividade celular. Além do mais apresenta muita variação entre os lotes utilizados, o que leva à necessidade de alto controle de qualidade e dificulta a padronização de protocolos experimentais (FRESHNEY, 2000).

Estudos que utilizam a adição de soro ao cultivo de células da granulosa de ovelha, (CAMPBELL, 1989; WEBB e MCBRIDGE, 1990) e de vaca (LANGHOUT *et al*, 1991), relatam que essas sofrem luteinização espontânea, resultando numa rápida queda da concentração de estradiol e aumento da secreção de progesterona (CAMPBELL, 1989; GONG *et al*, 1994; LANGHOUT *et al*, 1991) na cultura.

Observa-se, então, a necessidade do desenvolvimento de um sistema de cultura que seja capaz de manter a atividade estrogênica, uma vez que num folículo em desenvolvimento a relação estradiol : progesterona é alta.

Modelos que não utilizam soro em sua constituição são então necessários porque, embora o soro possua vários fatores essenciais para o desenvolvimento celular, como

hormônios, fatores de crescimento e de proliferação celular, é impossível controlar ou identificar os constituintes que afetam o processo de diferenciação celular (GUTIÉRREZ *et al*, 1997).

Um sistema de cultura livre de soro foi desenvolvido, no qual o soro foi substituído por albumina sérica bovina (BSA). Neste sistema, as células foliculares de ovinos (CAMPBELL *et al*, 1996) e bovinos (GUTIÉRREZ *et al*, 1997) mantiveram a secreção de estradiol aumentada por todo o tempo da cultura.

Gutiérrez *et al* (1997) descreveu pela primeira vez um sistema de cultura para células da granulosa bovinas, na qual a secreção de estradiol foi induzida e mantida por 6 dias em resposta a concentrações fisiológicas de FSH, IGF-I e insulina, o que proporcionou a diferenciação celular semelhante à situação *in vivo*, ou seja, foi criado um modelo que possibilita o estudo dos fatores fisiológicos que regulam a proliferação e diferenciação celular.

Mingotti (2002), no entanto, encontrou contaminação de progesterona no BSA, sendo este modelo considerado então um sistema semi-definido.

Montezor (2002) descreveu pela primeira vez um sistema de cultura de células da granulosa totalmente definido,  $\alpha$ -MEM + PVA, no qual o BSA foi substituído por álcool polivinílico (PVA), um doador de macromoléculas inerte. Nesse sistema, a produção de estradiol foi elevada até 48 horas de cultura e se manteve até 144 horas, além da morfologia das células ter sido preservada. Portanto, foi desenvolvido um sistema estritamente definido que permite o estudo dos fatores fisiológicos que regulam a proliferação e diferenciação celular.

As células da granulosa cultivadas sob tais condições mostraram *in vitro* atividade funcional de CG da fase folicular do ciclo estral, mantendo a sinalização oócito – CG que inclui a secreção de diferentes fatores, incluindo o OMI (inibidor da maturação oocitária). Conclui-se, então, que o desenvolvimento de um sistema de cultura definido de CG bovinas produtoras de estradiol mimetiza um folículo em desenvolvimento, permitindo a avaliação detalhada do desenvolvimento e esteroidogênese folicular e maturação oocitária (COLLARES e ROSA e SILVA, 2003; PICCINATO *et al*, 2002; ROSA e SILVA *et al*, 2002; VIREQUE *et al*, 2003).

O pequeno entendimento que temos a respeito da limitada aquisição de competência pelos oócitos durante a maturação *in vitro*, pode ser esclarecido através do cultivo destes em um sistema definido (Mc KIERNAN e BAVISTER, 1992).

Ali e Sirard (2002) utilizaram PVP (polivinil pirrolidone) e PVA, macromoléculas sintéticas na maturação *in vitro* de oócitos bovinos em substituição ao soro e ao BSA,

chegando a conclusão de que COCs bovinos podem ser maturados *in vitro* na ausência de soro, ou BSA, sem nenhum efeito negativo no desenvolvimento embrionário. Acharam, ainda, que a suplementação do meio de maturação com PVP-40 promove maior desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, do que quando o meio de cultivo é suplementado com soro ou BSA (34,6%, 20,6% e 17,4% respectivamente).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Meios de cultivo**

*-TCM-199+SFB*

O meio de cultura TCM-199 com sais de Earle's, L-glutamina e 2,200 mg/L de bicarbonato de sódio foi complementado com piruvato de sódio, Soro fetal bovino, FSH, penicilina e estreptomicina.

*- $\alpha$ -MEM+PVA* (definido)

O meio de cultura  $\alpha$ -MEM foi suplementado com alguns componentes, porém, este está sob sigilo de patente.

### **4.2. Coleta e manipulação dos ovários**

Foram utilizados ovários de vacas abatidas nos abatedouros Friboi ®, localizados em Formosa - GO, e Planaltina – DF, situados a aproximadamente uma hora e meia e uma hora, respectivamente, do Laboratório para Estudo da Reprodução –UnB, onde foram processados. Imediatamente após o abate, os ovários foram imersos em solução fisiológica a 35-38° C, acrescida de antibiótico (SIRARD e BILODEAU, 1990). Ao chegar ao laboratório, estes foram lavados em solução fisiológica pré-aquecida, acrescida de antibiótico e mantidos nesta mesma solução em banho-maria a 35°C durante os processos de dissecação e aspiração folicular.

### 4.3. Preparo das hemi-secções foliculares

Folículos entre 3 e 5 mm, com formato esférico e parede translúcida foram dissecados com auxílio de tesouras e bisturi, em placas de petri e ambiente estéril e foram mantidos em PBS aquecido até serem seccionados para serem colocados em cultivo. As hemi-secções foram lavadas uma vez em PBS aquecido a 38° C e uma vez no meio de cultivo, sendo incubadas 10 hemi-secções /1000 µL de meio em estufa com 95% de umidade, 5% de CO<sub>2</sub>, a 38,5° C, por 24 horas.

Foram utilizados dois meios de cultivo, para comparação. Um meio quimicamente definido,  $\alpha$ - MEM + PVA, por permitir a padronização destes procedimentos, e o meio de cultura de tecidos, TCM 199 + SFB como controle, por se tratar do meio de maturação tradicionalmente utilizado.

### 4.4. Recuperação dos oócitos

Os *complexos cumulus oophorus* (COCs) foram aspirados de folículos entre 2 e 8 mm de diâmetro, com boa vascularização e coloração do fluido folicular. A aspiração foi feita com seringas de 10 mililitros de volume acopladas a agulhas de 25 x 8. O fluido folicular foi depositado em cálice cônico mantido em banho-maria a 35° C. Quinze minutos após o término da aspiração foi esperado para que houvesse a decantação dos COCs e células da granulosa. Após 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e, o sedimento, ressuspenso em PBS e transferido para placa de Petri mantida em placa aquecedora, na temperatura de 38°C. Com o auxílio de microscópio estereoscópio, os COCs foram selecionados. Os critérios para seleção seguiram os parâmetros de Blondin e Sirard, (1995). Foram cultivados COCs que apresentaram citoplasma escuro e homogêneo, podendo apresentar pequenas irregularidades e com no mínimo três camadas de células do *cumulus* compactas, uniformes e sem pigmentações. Os COCs selecionados foram transferidos para uma placa escavada, onde foram lavados duas vezes em meio PBS e uma vez no meio de cultivo do respectivo tratamento. Os cultivos foram realizados em placas Nunc de quatro poços, em estufa com 95% de umidade, 5% de CO<sub>2</sub>, a 38,5° C, por 24 ou 48 horas.

#### 4.5. Delineamento experimental

##### **Experimento 1- Sistema de pré-maturação: Inibição da maturação nuclear de COCs pelo co-cultivo com hemi-seções foliculares em meio definido e em meio padrão.**

Um total de 443 COCs foi distribuído aleatoriamente nos seguintes tratamentos:

G1: TCM-199 + SFB (grupo controle: meio de MIV padrão para acompanhamento da maturação)

G2: TCM-199 + SFB + (HS)

G3:  $\alpha$ -MEM + PVA

G4:  $\alpha$ -MEM + PVA + (HS)

Todos os cultivos foram realizados em placas Nunc de 4 poços, sendo que o tratamento G1, continha 400 microlitros cada poço e os tratamentos G2, G3 e G4 1000 microlitros. Foram cultivados 20-25 COCs com 10 HS. Após 24 horas de cultivo em estufa com 95% de umidade, 5% de CO<sub>2</sub>, a 38,5° C, os meios de cultivo foram coletados e armazenados a -20°C para posterior dosagem dos hormônios estradiol e progesterona. Os COCs seguiram pelo protocolo de avaliação da maturação nuclear.

#### AValiação da Maturação Nuclear

Após 24 horas de cultivo, os COCs foram retirados dos respectivos tratamentos e desnudados mecanicamente, em PBS aquecido, com o auxílio da pipeta de 100 $\mu$ L. Após o desnudamento, estes foram fixados em solução de etanol - ácido acético 3:1, por um período mínimo de 48 horas e no máximo 2 meses. A seguir, procedeu-se a coloração com lacmóide 1%, para posterior avaliação do estágio da meiose, com o auxílio do microscópio óptico de contraste de fase, nos aumentos de 40 e 100x. Os seguintes estágios da maturação nuclear foram avaliados:

Vesícula germinativa, quebra da vesícula germinativa e condensação cromossômica, que foram considerados **estágios imaturos**.

Metáfase I, anáfase I e telófase I, que foram considerados **estágios intermediários**.

Metáfase II, que foi considerado **estágio maduro**.

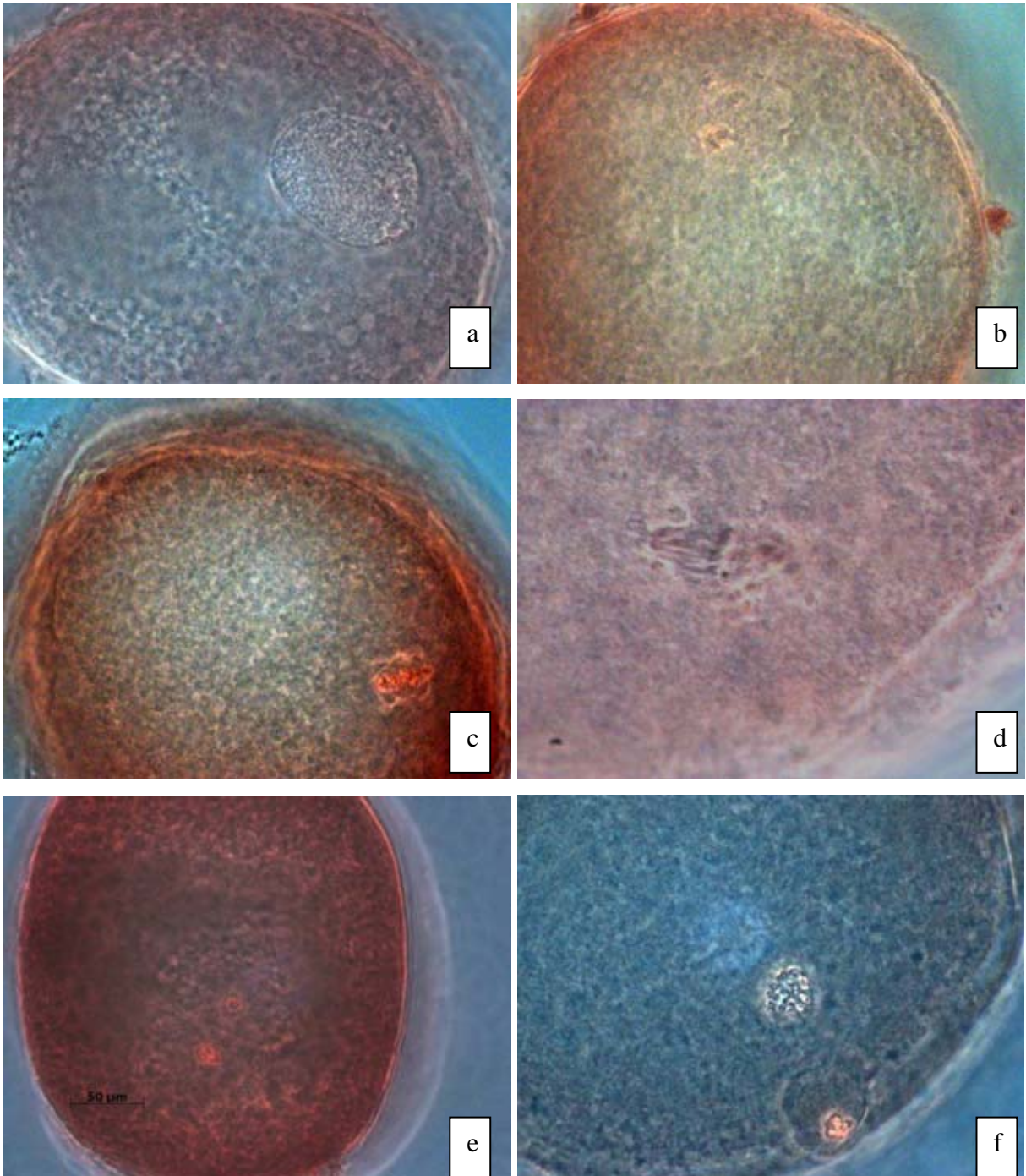


Figura 1: Configurações cromossômicas da meiose. a; oócito em vesícula germinativa. b; oócito em quebra da vesícula germinativa. c; oócito em metáfase I. d; oócito em anáfase I. e; oócito em telófase I. f; oócito em metáfase II.



## **Experimento 2- Sistema de maturação de COCs pré-maturados com HS e em meio definido: Análise do potencial de reversibilidade da inibição**

Um total de 390 COCs foi distribuído aleatoriamente nos mesmos grupos experimentais do experimento 1.

Todos os cultivos foram realizados em placas nunc de 4 poços, sendo que o tratamento G1, continha 400 microlitros cada poço e os tratamentos G2, G3 e G4, 1000 microlitros.

Após 24 horas de cultivo em estufa com 95% de umidade, 5% de CO<sub>2</sub>, a 38,5° C, os meios de cultivo foram coletados e armazenados a -20°C para posterior dosagem dos hormônios estradiol e progesterona. Os COCs pertencentes ao tratamento G1, seguiram pelo protocolo de avaliação da maturação nuclear e os COCs pertencentes aos tratamentos G2, G3 e G4 foram lavados uma vez em PBS aquecido e uma vez em TCM-199 + SFB e transferidos para uma placa nunc de 4 poços, contendo 1000 µL de meio TCM-199 + SFB, onde foram cultivados por mais 24 horas. Após 24 horas de cultivo, os COCs dos tratamentos G2, G3 e G4 também passaram pelo processamento para avaliação do estágio da meiose e os meios de cultivo foram coletados e armazenados a -20°C para posterior dosagem dos hormônios estradiol e progesterona.

### **Determinação da concentração de 17 β estradiol (E2) e Progesterona (P4) nos meios de cultura referentes aos experimentos 1 e 2.**

Os meios de cultivo dos experimentos de pré-maturação (1) e reversão (2) foram armazenados a -20°C, para subsequente dosagem hormonal.

A concentração dos hormônios foi detectada através da utilização de kits de radioimunoensaio da marca Coat- A- Count.

O procedimento Coat- A- Count, baseia-se em tubos revestidos com anticorpos. O esteróide marcado com <sup>125</sup>I compete com o hormônio da amostra por locais de fixação dos anticorpos. Após a incubação, a separação entre ligado e livre é conseguida por decantação. O tubo é então colocado num contador gama e as contagens são inversamente relacionadas com a quantidade de hormônio presente na amostra. A quantidade de hormônio da amostra é determinada através da comparação das contagens com uma curva de calibração (Manual Coat- A- Count).

## DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE $17\beta$ ESTRADIOL (E2) E PROGESTERONA (P4):

Aos tubos marcados com anticorpo anti-estradiol, ou anti-progesterona, foram adicionados 50 $\mu$ L das amostras, 50  $\mu$ L do calibrador A e 1000  $\mu$ L de estradiol marcado com  $^{125}\text{I}$  para dosagem de E2. Aos tubos marcados com anticorpo anti-progesterona, foram adicionados 10 $\mu$ L das amostras, 90  $\mu$ L do calibrador A e 1000  $\mu$ L de progesterona marcada com  $^{125}\text{I}$  para dosagem de P4. Estes tubos foram agitados por vortex e colocados em banho-maria a 37°C por uma hora. Decorrido o tempo de incubação, o conteúdo dos tubos foi desprezado e estes foram levados para o contador gama fazer as medições. Antes da medida, foi feita uma curva de calibração fornecida pelo kit para a determinação da concentração de E2 e P4.

O limite de detecção do kit de radioimunoensaio para o estradiol é de 10 pg/mL, e o coeficiente de variação intra-ensaio e inter-ensaio foi 7% e 8,1%, respectivamente e o limite de detecção do para progesterona é de 0,03 ng/mL, e o coeficiente de variação intra-ensaio e inter-ensaio foi 13,2% e 14,8% respectivamente.

## **Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) para avaliação da maturação citoplasmática de COCs provenientes dos experimentos de pré-maturação (1) e reversão (2).**

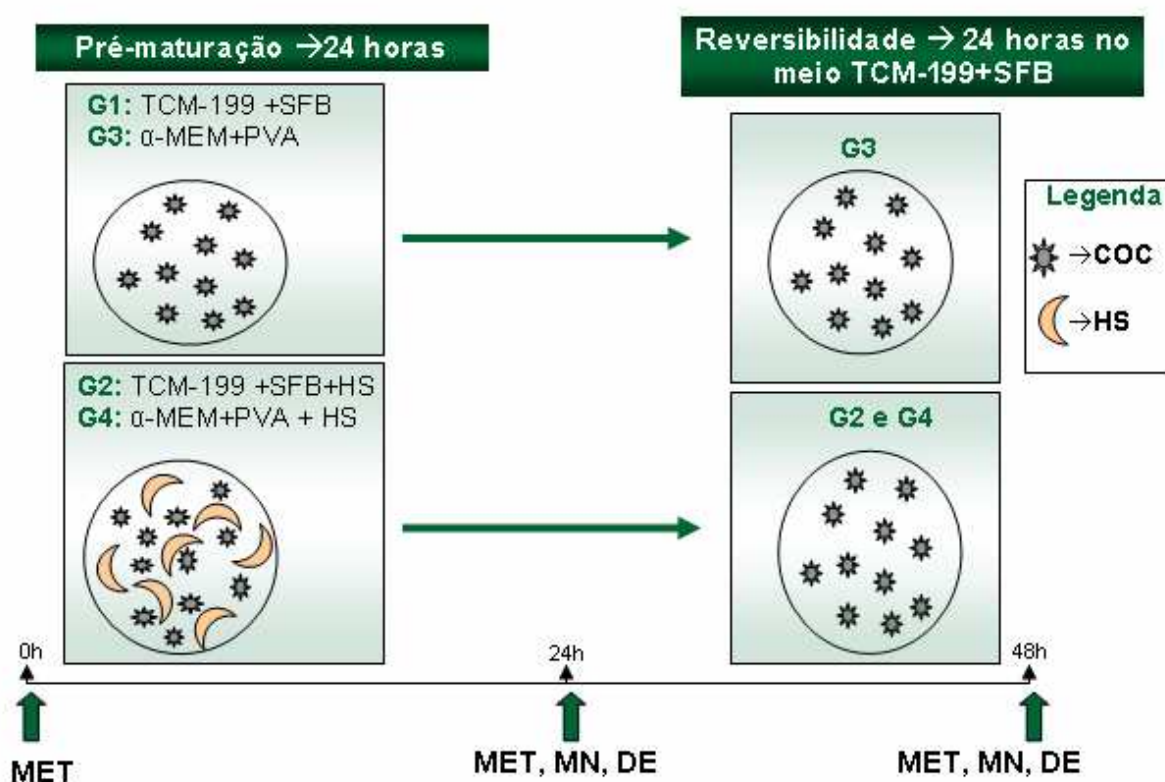
Em média quatro COCs provenientes dos tratamentos G1, G2, G3 e G4 do experimento 1, dos tratamentos G2, G3 e G4 do experimento 2 e do tempo 0 h, ou seja, sem serem cultivados, foram processados para análise ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM- 1011.

Estes COCs foram fixados em fixador Karnovsky (2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, 3% de sacarose em meio tamponado por cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,5) por uma hora e pós-fixados por uma hora com a solução de ferricianeto de potássio (0,8% de ferricianeto de potássio, cloreto de cálcio 10 mM, tampão cacodilato de sódio 0,2 M) tetróxido de ósmio 1% 1:1. Em seguida, a contrastação *in bloc*, foi realizada em solução de acetato de uranila 0,5%, por duas horas e a desidratação em soluções de concentrações crescentes de acetona (30 – 100%). Ao término desta etapa, iniciou-se a infiltração e inclusão em resina spurr, e então os COCs foram emblocados. Cortes semi-finos, foram feitos para

observação em microscópio óptico. Estes foram colocados em lâmina de vidro e corados com azul de toluidina.

Foram feitos cortes ultra-finos (90 nm) no ultramicrotomo Reichert Supernova, recolhidos em grids de cobre, 150 mesh, que posteriormente foram contrastados em solução de acetato de uranila saturado (3%) e citrato de chumbo 1% e analisados e fotografados no microscópio eletrônico JOEL JEM- 1011, operado a 80 KV.

#### ESQUEMA DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



**MET :** Microscopia eletrônica de transmissão para avaliação da maturação citoplasmática

**MN:** Avaliação da maturação nuclear

**DE:** Dosagem dos esteróides E2 e P4.

#### 4.6. Análise estatística

Para o estudo do efeito dos diferentes sistemas de cultivo sobre a maturação nuclear dos COCs foram realizadas 10 repetições para o experimento de pré-maturação (1) e 9 repetições para o experimento de reversão (2). Os dados foram analisados pela fração do número total de oócitos cultivados sobre o número de oócitos classificados (%) em imaturos, intermediários, e maduros. As porcentagens de COCs em cada estágio da maturação nuclear, nos diferentes tratamentos foram analisados pelo teste do Qui-quadrado usando o programa Statistical Analysis System (SAS ®).

Para o estudo da produção de esteróides nos diferentes sistemas de cultivo, foi feita uma análise de variância, usando o programa Statistical Analysis System (SAS ®). As fontes de variação incluíram a interação entre os tratamentos. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

Para a comparação de médias foi utilizado o teste de Tukey pelo programa SAS ®.

A análise estatística foi realizada pela Profa. Dra. Concepta Margaret McManus Pimentel, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília.

## **5. RESULTADOS**

### **Experimento 1- Sistema de pré-maturação: inibição da maturação nuclear de COCs pelo co-cultivo com hemi-seções foliculares em meio definido e em meio padrão**

Um total de 443 oócitos foram distribuídos aleatoriamente nos tratamentos G1, G2, G3 e G4. Após a pré-maturação, os oócitos foram fixados e analisados quanto ao estágio de maturação nuclear. Os resultados mostrados são produto de 10 repetições.

A avaliação da progressão da meiose em resposta aos tratamentos mostra que todos os grupos, exceto o grupo controle G1 (TCM 199 + SFB), apresentaram inibição da retomada da maturação nuclear, fazendo com que os COCs permanecessem no estágio imaturo, após 24 horas de pré-maturação (figura 2) (tabela 1). Portanto, tanto a HS, quanto o meio definido mantiveram a maturação nuclear bloqueada neste período.

As configurações cromossômicas dos estágios da meiose podem ser observadas na figura 1.

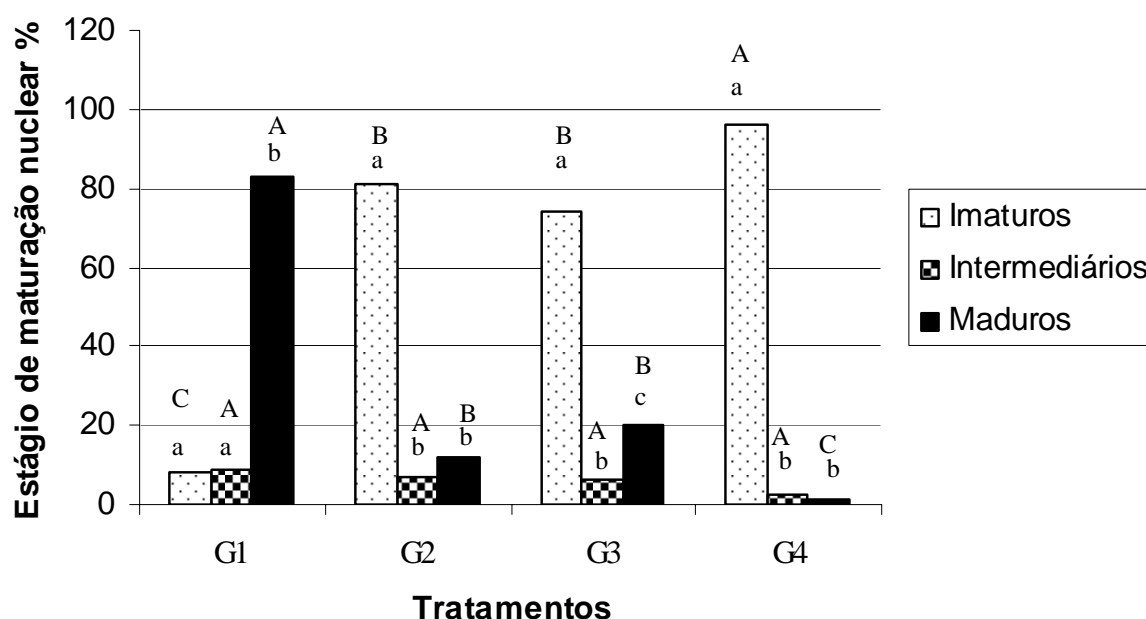


Figura 2: Estágio de maturação nuclear de COCs (n = 443) após pré-maturação - Porcentagem de oócitos imaturos, intermediários e maduros.

Letra maiúscula diferente dentro de cada estágio da maturação significa que houve diferença (Qui-quadrado;  $P < 0,05$ ).

Letra minúscula diferente dentro de cada tratamento significa que houve diferença (Qui-quadrado;  $P < 0,05$ ).

Tabela 1: Distribuição percentual do estágio da maturação nuclear apresentado pelos oócitos após pré-maturação (experimento 1).

Estágios da maturação	Tratamentos			
	TCM-199 + SFB (G1) (N° absoluto/total)	TCM-199 + SFB +HS (G2)	$\alpha$ -MEM + PVA (G3)	$\alpha$ -MEM + PVA + HS (G4)
<b>Imaturos</b>	7,9 C a (8/101)	81,2 B a (104/124)	74,0 B a (97/131)	96,3 A a (80/83)
<b>Intermediários</b>	8,9 A a (9/101)	7,0 A b (9/124)	6,1 A b (8/131)	2,4 A b (2/83)
<b>Maduros</b>	83,1 A b (84/101)	11,7 B b (15/124)	19,8 B c (26/131)	1,2 C b (1/83)

Letra maiúscula diferente dentro de cada estágio da maturação, mesma linha, significa que houve diferença (Qui-quadrado;  $P < 0,05$ ).

Letra minúscula diferente dentro de cada tratamento, mesma coluna, significa que houve diferença (Qui-quadrado;  $P < 0,05$ ).

Os estágios intermediários foram pouco frequentes nos diferentes tratamentos (figura 1: c, d, e).

### **Experimento 2- Sistema de maturação de COCs pré-maturados com HS em meio definido e em meio padrão: Análise do potencial de reversibilidade da inibição**

Um total de 390 oócitos foi analisado quanto ao estágio de maturação nuclear para avaliação do potencial de reversibilidade da inibição da meiose. Os COCs foram distribuídos aleatoriamente nos tratamentos G1, G2, G3 ou G4. Foram realizadas 9 repetições.

Após 24 h de pré-maturação, os COCs dos tratamentos G2, G3 e G4 foram cultivados por mais 24 h no meio de maturação padrão, TCM-199 + SFB, para análise do potencial de reversibilidade da inibição da progressão da meiose.

Somente os COCs cultivados em meio definido ( $\alpha$ -MEM+PVA) apresentaram taxa de reversibilidade de 81,82%, como pode ser observado na figura 3 e na tabela 2. Porém, na presença de HS, os COCs mantiveram o bloqueio da maturação, como observado no período pré-maturacional (figura 3 e tabela 2).

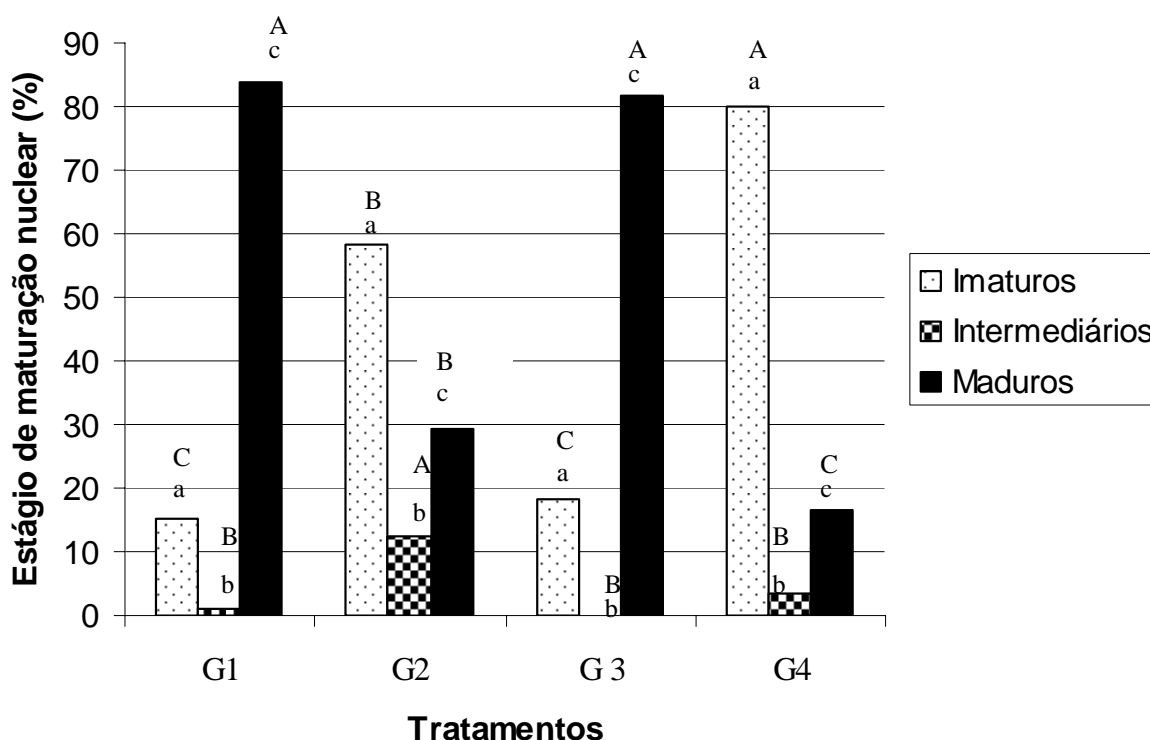


Figura 3: Estágio de maturação nuclear de COCs (n =390) cultivados por 24 horas em meio de maturação padrão, após 24 horas de pré-maturação - Porcentagem de oócitos imaturos, intermediários e maduros.

Letra maiúscula diferente dentro de cada estágio da maturação significa que houve diferença (Qui-quadrado;  $P < 0,05$ ).

Letra minúscula diferente dentro de cada tratamento significa que houve diferença (Qui-quadrado;  $P < 0,05$ ).

Tabela 2: Distribuição percentual do estágio da maturação nuclear apresentado pelos oócitos após cultivo em meio de maturação padrão que ocorreu após sistema de pré-maturação.

Estágios da maturação	Tratamentos			
	TCM-199 + SFB (G1) (N° absoluto/total)	TCM-199 + SFB +HS (G2)	$\alpha$ -MEM + PVA (G3)	$\alpha$ -MEM + PVA + HS (G4)
<b>Imaturos</b>	15,2 C a (14/92)	58,3 B a (42/72)	18,1 C a (20/110)	80,1 A a (93/116)
<b>Intermediários</b>	1,0 B b (1/92)	12,5 A b (9/72)	0 B b (0/110)	3,4 B b (4/116)
<b>Maduros</b>	83,7 A c (77/92)	29,1 B c (21/72)	81,8 A c (90/110)	16,3 C c (19/116)

Letra maiúscula diferente dentro de cada estágio da maturação, mesma linha, significa que houve diferença. Letra minúscula diferente dentro de cada tratamento, mesma coluna, significa que houve diferença (Qui-quadrado;  $P < 0,05$ ).



### **Determinação da concentração de 17 $\beta$ estradiol (E2) e Progesterona (P4) nos meios de cultura referentes aos experimentos 1 e 2.**

Os meios de cultura referentes aos experimentos de pré-maturação (1) e reversão (2) foram analisados para determinação da produção dos esteróides E2 e P4 sintetizado pelas células foliculares da HS e pelas células do *cumulus oophorus*.

Amostras coletadas no fim do período de cultivo de cada experimento foram utilizadas para determinação da concentração dos hormônios que foi feita através de kits de radioimunoensaio.

O resultado da determinação da concentração de estradiol no experimento 1, mostra que a secreção deste esteróide é significativamente maior no tratamento G3 ( $\alpha$ -MEM + PVA), onde as células do *cumulus* secretaram durante as 24 horas de pré-maturação 2444,24 pg/mL. O tratamento G1 (TCM-199 + SFB) foi o que secretou menos deste hormônio, 40,99 pg/mL, como pode ser observado na figura 4 e na tabela 3.

Também foi observado que a presença da HS na co-cultura em meio padrão (TCM-199 + SFB), aumenta a secreção de E2. No entanto, a concentração deste hormônio em meio definido ( $\alpha$ -MEM + PVA) é diminuída na presença da HS em comparação ao cultivo sem HS tratamento (G3).

Na co-cultura de COCs e HS (tratamentos G2 e G4), concentrações mais altas de P4 são observadas e nesta situação o meio que contém SFB (G2) exibe a maior concentração (figura 5 e tabela 3).

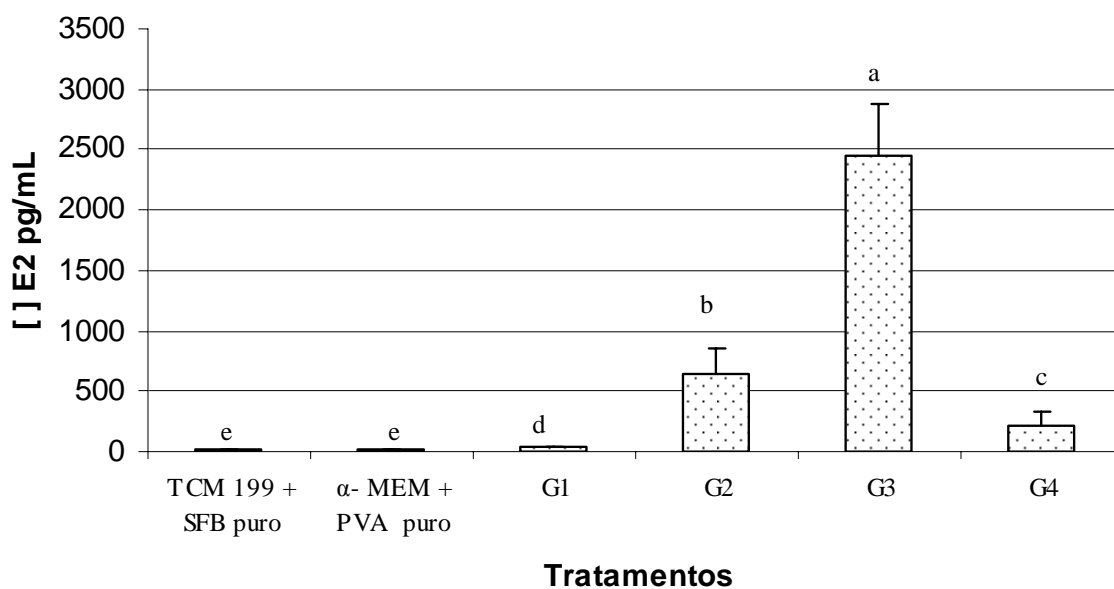


Figura 4: Concentração de E2 nos meios de cultura referentes ao experimento 1 (Pré-maturação). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes sobrescritas representam diferença estatística (análise de variância;  $P < 0,0001$ ).

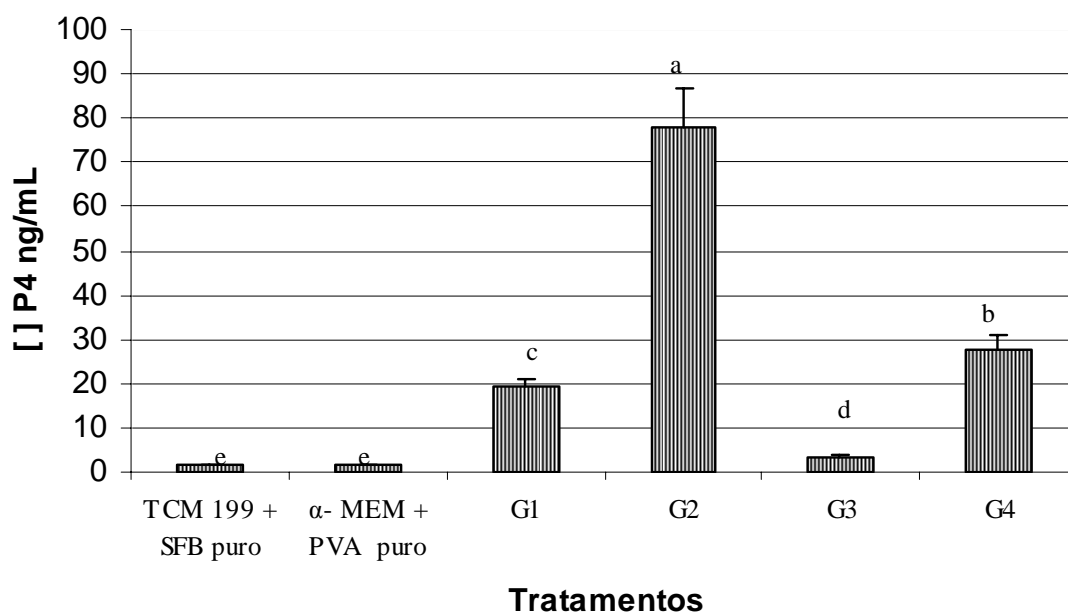


Figura 5: Concentração de P4 nos meios de cultura referentes ao experimento 1 (Pré-maturação). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes sobrescritas representam diferença estatística (análise de variância;  $P < 0,0001$ ).

Tabela 3: Concentração dos esteróides E2 e P4 secretados pelas células foliculares da HS e pelas células do *cumulus* nos diferentes tratamentos durante o experimento de pré-maturação.

Tratamento (n)	Estradiol (E2)			Progesterona (P4)	
	pg/mL	± EPM		ng/mL ± EPM	
TCM 199 + SFB puro (19)	12,4	± 2,46	e	1,4 ± 0,09	e
α - MEM + PVA puro (18)	15,9	± 5,62	e	1,5 ± 0,13	e
TCM 199 + SFB (G1) (21)	40,9	± 6,23	d	19,3 ± 1,77	c
TCM 199+SFB+HS (G2) (22)	637,7	± 226,32	b	77,8 ± 8,69	a
α -MEM +PVA (G3) (24)	2444,2	± 428,44	a	3,4 ± 0,24	d
α -MEM+PVA+ HS (G4) (20)	221,5	± 112,52	c	27,5 ± 3,33	b

Letras diferentes na mesma coluna diferem, ( $P < 0,0001$ ). Média ± EPM.

COCs dos grupos G2, G3 e G4 foram submetidos a 24 h suplementares de cultivo em meio padrão para análise da reversibilidade da inibição da maturação nuclear. O resultado da concentração de E2 neste experimento, mostra que a concentração de E2 foi maior nos meio de cultura do tratamento G3, pré-maturados em meio definido, como pode ser visto na figura 6 e na tabela 4.

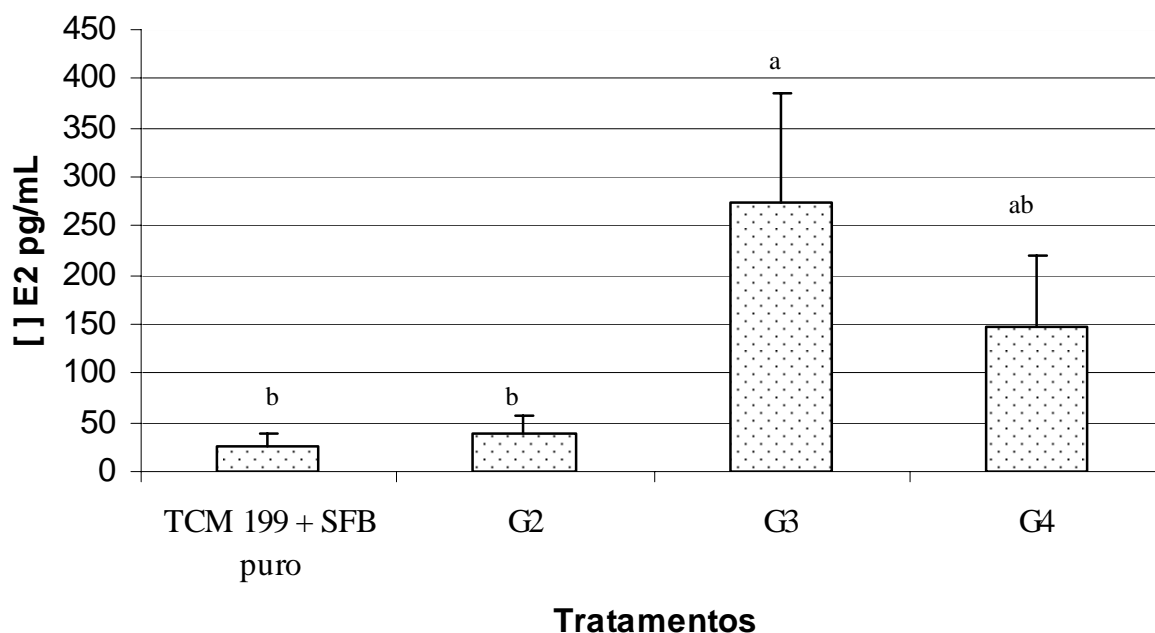


Figura 6: Concentração de estradiol secretada pelas células do *cumulus* nos diferentes tratamentos do experimento 2. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes sobrescritas representam diferença estatística (análise de variância;  $P < 0,06$ )

O resultado da determinação da concentração de progesterona no experimento 2 mostrou que a presença da HS no meio de cultura de COCs pré-maturados com TCM-199 + SFB ou  $\alpha$ -MEM + PVA têm a mesma concentração de P4, e que níveis máximos de P4 são sintetizados pelas células do *cumulus* de COCs pré-maturados em meio de cultura definido, (tratamento G3  $\rightarrow$   $\alpha$ - MEM + PVA), onde foi secretado 273,39 pg/mL deste esteróide. (Figura 7 e tabela 4).

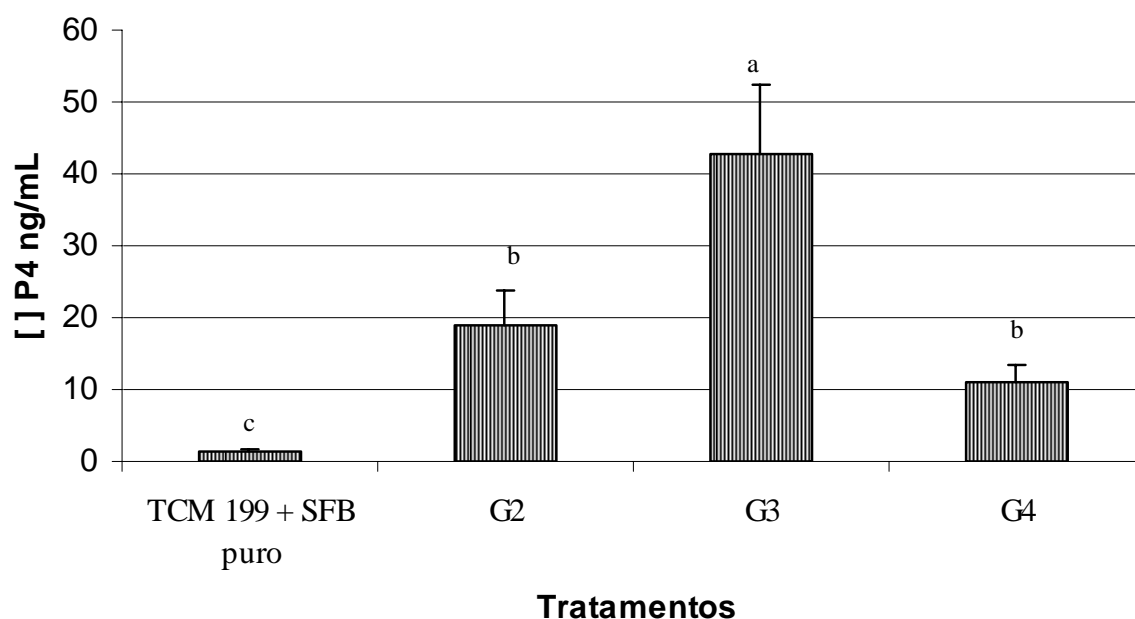


Figura 7: Concentração de progesterona secretada pelas células do *cumulus* nos diferentes tratamentos do experimento 2. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes sobrescritas representam diferença estatística. (análise de variância;  $P < 0,0032$ )

Tabela 4: Concentração dos esteróides E2 e P4 secretados pelas células do *cumulus* no meio de cultura de maturação padrão (TCM-199+ SFB) puro e neste mesmo meio de cultura em sistema de maturação de oócitos provenientes de tratamentos indutores de inibição de maturação nuclear (G2, G3 e G4).

Treatment (n)	Estradiol (E2) pg/mL $\pm$ EPM	Progesterona (P4) ng/mL $\pm$ EPM
TCM 199 + SFB puro (11)	24,7 $\pm$ 13,41 b	1,4 $\pm$ 0,21 c
TCM 199+SFB+HS (G2) (10)	37,8 $\pm$ 20,31 b	19,0 $\pm$ 4,75 b
$\alpha$ -MEM +PVA (G3) (10)	273,3 $\pm$ 113,22 a	42,8 $\pm$ 9,45 a
$\alpha$ -MEM+PVA+ HS (G4) (11)	147,2 $\pm$ 71,83 ab	11,0 $\pm$ 2,39 b

Letras diferentes na coluna da [ ] de P4 diferem, ( $P < 0,0032$ ). Média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

**Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) para avaliação da maturação citoplasmática de COCs provenientes dos experimentos de pré-maturação (1) e reversão (2).**

Foram fixados e analisados em média 4 oócitos por tratamento e quatro oócitos no tempo zero por se tratar de uma análise qualitativa. Os tratamentos analisados foram:

Referentes ao experimento 1 (pré-maturação), os tratamentos **G1** (TCM-199 + SFB), **G2** (TCM-199 + SFB + HS), **G3** ( $\alpha$ -MEM + PVA), e **G4** ( $\alpha$ -MEM + PVA + HS),

Os tratamentos referentes ao experimento 2 (análise do potencial de reversibilidade da inibição da meiose) foram: **G2** (TCM-199 + SFB + HS), **G3** ( $\alpha$ -MEM + PVA), e **G4** ( $\alpha$ -MEM + PVA + HS).

Como o tratamento G1 é um controle, e os resultados da maturação nuclear deste tratamento nos experimentos 1 e 2 não diferiram estatisticamente, os oócitos referentes a ele foram fixados e analisados somente no experimento 1.

**Tempo Zero:** Os oócitos analisados neste grupo mostraram características de oócitos imaturos, como observado na figura 8.

As células do *cumulus* não se expandiram, não foi observada a presença de espaço perivitelínico, a membrana plasmática possui pequenas microvilosidades paralelas em relação à zona pelúcida, foi notada a presença de junções *Gap*, as mitocôndrias se distribuíram principalmente na região cortical e os grânulos corticais apresentam-se agrupados e localizam-se mais no interior do oócito.

**Tratamento G1: TCM-199 + SFB:** Neste tratamento observa-se a maturação completa dos oócitos, como era esperado, podendo ser visto na figura 9.

Foi observado que houve uma notável expansão das células do *cumulus*, há a presença de espaço perivitelínico, a membrana plasmática apresenta microvilosidades eretas e grânulos corticais isolados e alinhados a ela, houve a migração das mitocôndrias para uma região mais central, as organelas se organizaram em associações formando um aspecto de teia com espaços livres de organelas, grande quantidade de retículo endoplasmático liso foi encontrada próxima à membrana plasmática.

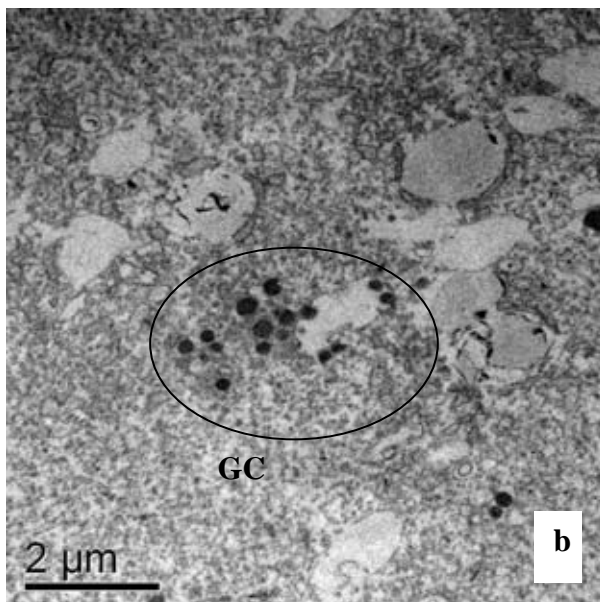
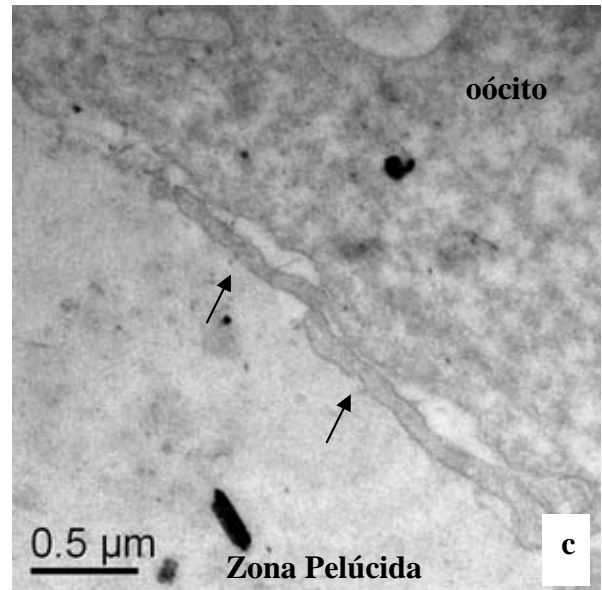
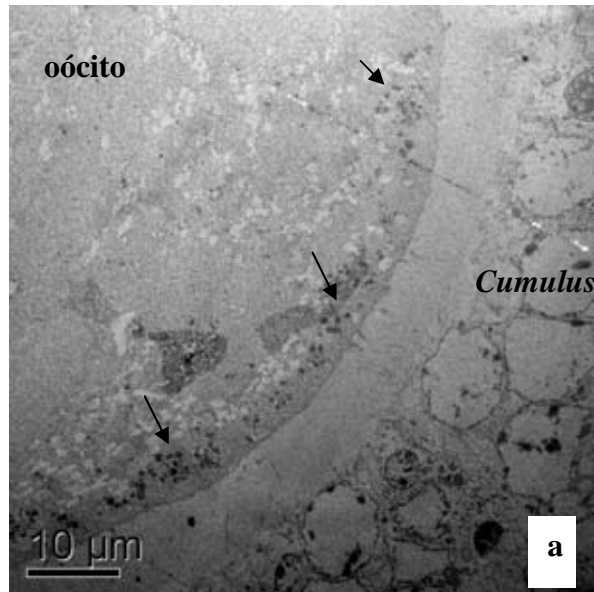


Figura 8: Características ultra-estruturais de oócitos bovinos imaturos, tempo zero. (GC- grânulos corticais)

a) aspecto geral do citoplasma, as mitocôndrias (setas) encontram-se distribuídas próximas a região cortical, as células do *cumulus* se apresentam sem expansão (aumento 2000X). b) grânulos corticais organizados em grupos (aumento 15000X). c) microvilosidades paralelas à membrana plasmática (setas) (aumento 50000X).

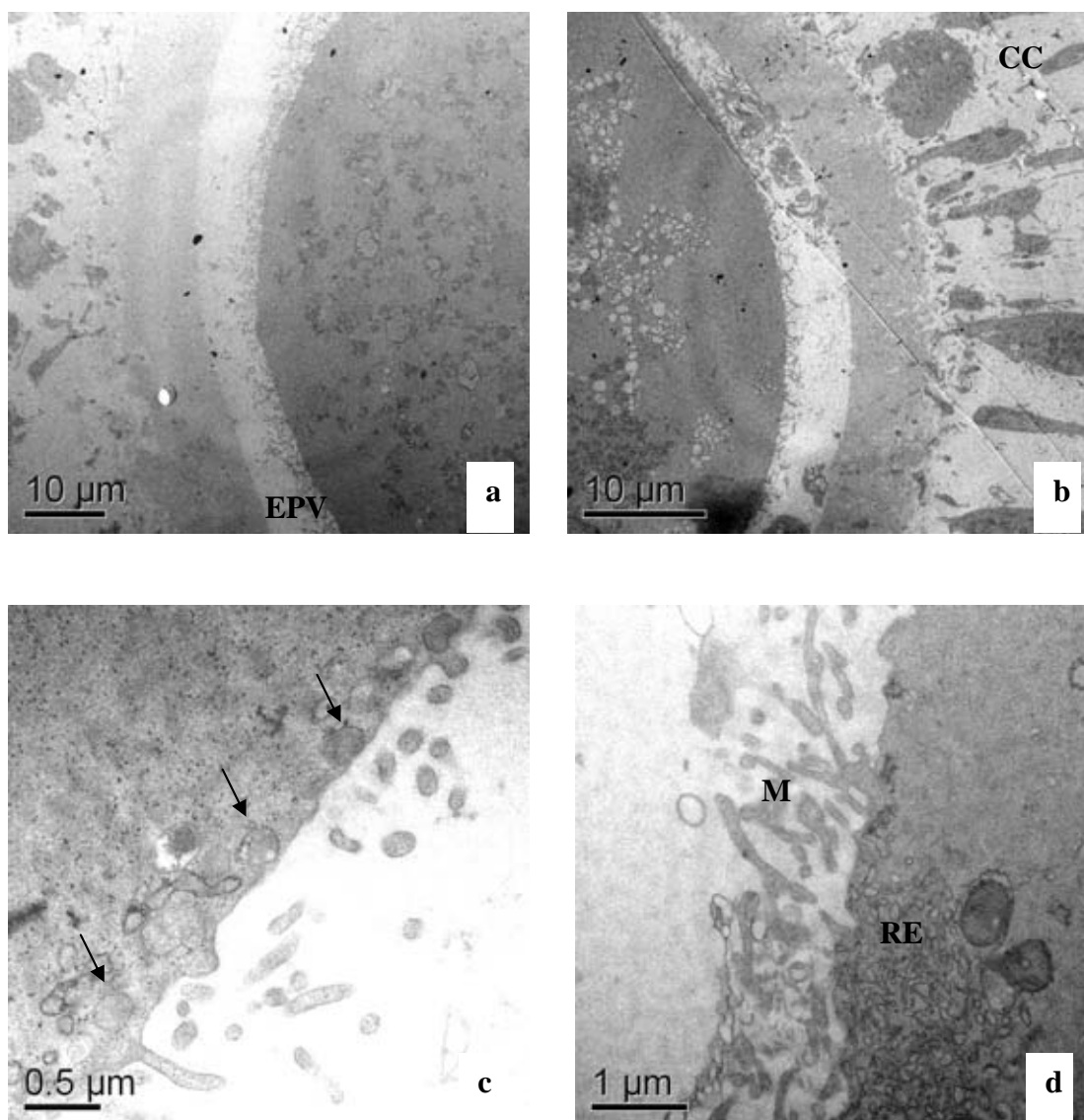


Figura 9: Características ultra-estruturais de oócitos bovinos maduros, após tratamento G1, TCM -199 + SFB. (EPV- espaço perivitelinico; CC- células do *cumulus*; M- microvilosidades; RE- retículo endoplasmático)

a e b) aspecto geral do citoplasma (aumento 3000X). Note a organização das organelas em teia por todo o citoplasma. O espaço perivitelinico é bem evidente e as células do *cumulus* estão bem expandidas. c) grânulos corticais isolados e alinhados com a membrana plasmática (setas) (aumento 40000X). d) microvilosidades eretas e bem desenvolvidas e grande quantidade de retículo endoplasmático liso próximo à membrana plasmática (aumento 2500X).



#### Tratamento G4: Alfa-MEM + PVA + HS

##### - Experimento 1- pré-maturação:

O citoplasma do oócito apresentava sinais de degeneração, repleto de substâncias amorfas, as mitocôndrias encontradas se organizaram na periferia do oócito e não possuíam lamelas, o *cumulus* não expandiu, a membrana plasmática não apresentou microvilosidades e possuía um aspecto indefinido, não foram observados espaço perivitelínico, nem grânulos corticais (figura 10).

##### - Experimento 2- Reversão:

As células do *cumulus* não expandiram, a membrana plasmática não apresentou microvilosidades e tinha aspecto indefinido, o citoplasma estava repleto de substâncias amorfas, as mitocôndrias, sem lamelas, se organizaram em grumos na periferia e no interior do oócito, não foi observada a presença de grânulos corticais (figura 11). Os oócitos apresentaram sinais claros de degeneração.

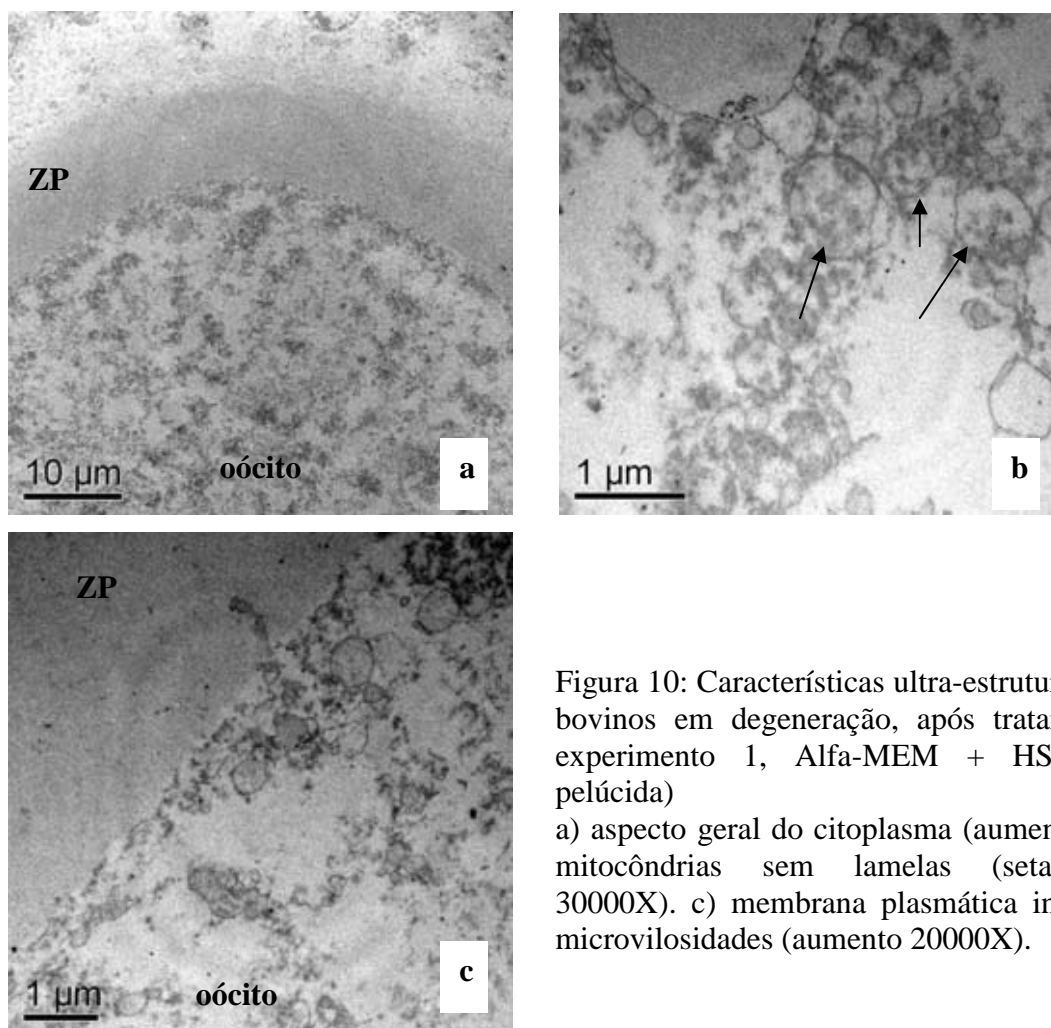


Figura 10: Características ultra-estruturais de oócitos bovinos em degeneração, após tratamento G4 do experimento 1, Alfa-MEM + HS. (ZP- zona pelúcida)

a) aspecto geral do citoplasma (aumento 2500X). b) mitocôndrias sem lamelas (setas) (aumento 30000X). c) membrana plasmática indefinida, sem microvilosidades (aumento 20000X).

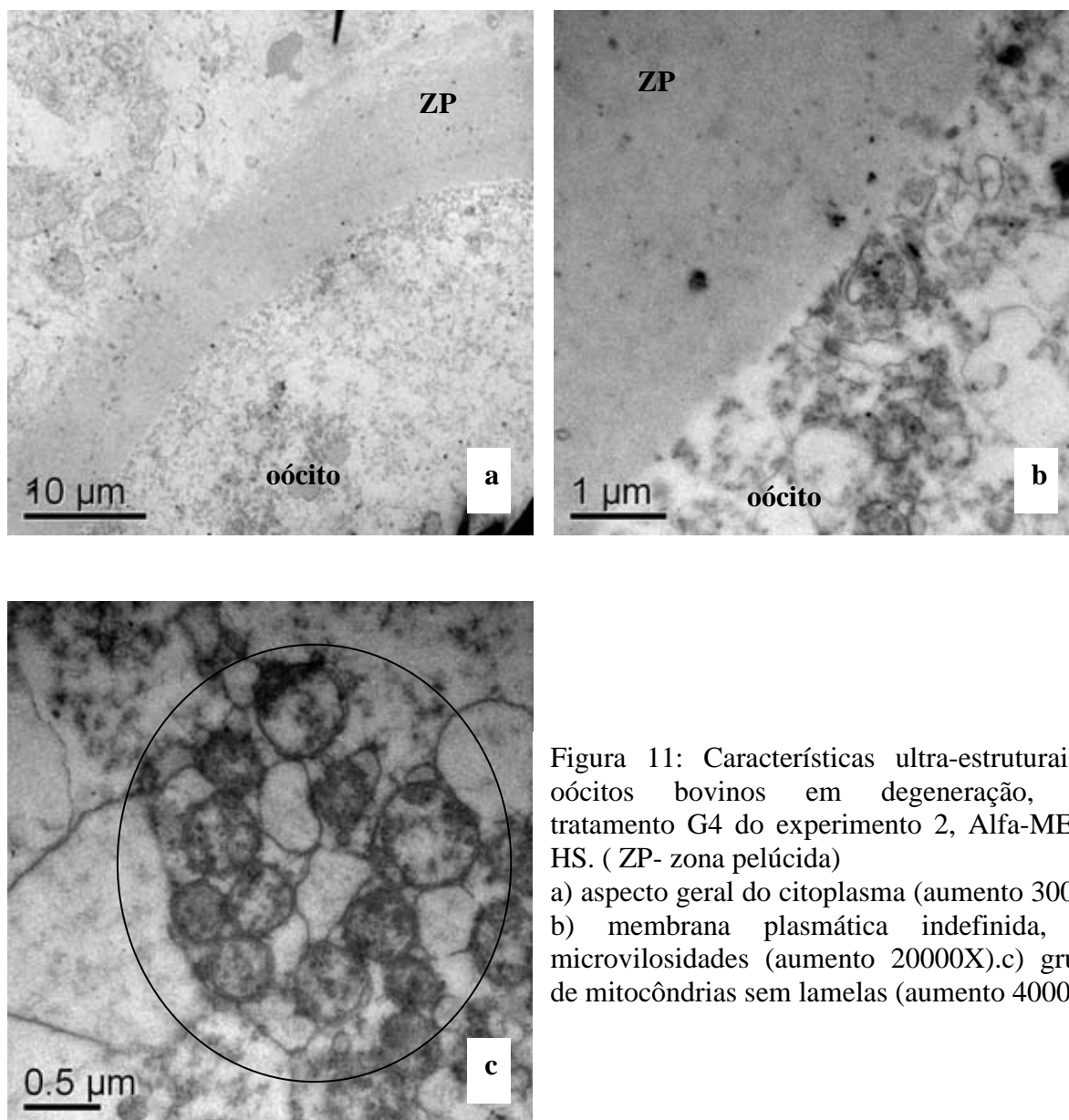


Figura 11: Características ultra-estruturais de oócitos bovinos em degeneração, após tratamento G4 do experimento 2, Alfa-MEM + HS. ( ZP- zona pelúcida)  
 a) aspecto geral do citoplasma (aumento 3000X).  
 b) membrana plasmática indefinida, sem microvilosidades (aumento 20000X).c) grumos de mitocôndrias sem lamelas (aumento 40000X).

### Tratamento G3: Alfa-MEM + PVA

#### - Experimento 1- pré-maturação:

Foram observadas características de imaturidade e de maturação. As células do *cumulus* não se expandiram, não foi observada a presença de espaço perivitelínico, os grânulos corticais se organizaram em grumos localizados no interior do oócito, características de um oócito imaturo. No entanto, a membrana plasmática apresentou microvilosidades eretas, uma grande quantidade de retículo endoplasmático liso foi notada principalmente próximo à membrana plasmática, as mitocôndrias foram encontradas principalmente, mas não exclusivamente, na região cortical, que mostra o início do processo de migração e grande

quantidade de retículo endoplasmático liso foi encontrada próxima à membrana plasmática. Características que mostram o início da maturação citoplasmática (figura 12).

### - Experimento 2- Reversão:

As células do *cumulus* se expandiram, foi observada a presença de espaço perivitelínico, a membrana plasmática apresentou bastantes microvilosidades eretas, os grânulos corticais se isolaram e alinharam com a membrana plasmática, as mitocôndrias migraram para o interior do oócito e estavam sempre em associação com vesículas. Grande quantidade de retículo endoplasmático liso foi encontrada próxima à membrana plasmática. Aspecto condizente com oócitos maduros (figura 13).

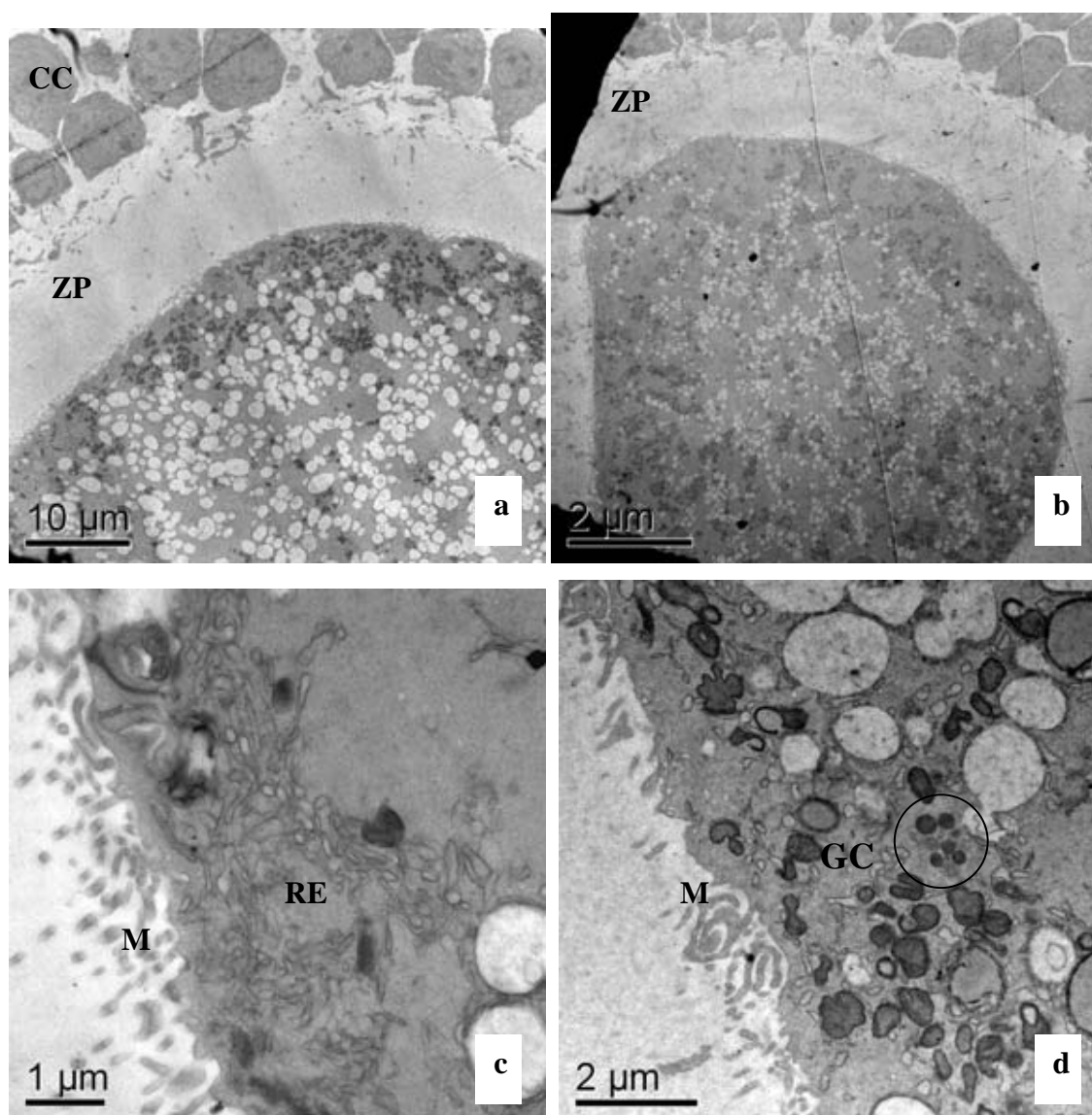


Figura 12: Características ultra-estruturais de oócitos bovinos, após tratamento G3, Alfa-MEM + PVA, do experimento 1. (ZP- zona pelúcida; CC- células do *cumulus*; M- microvilosidades; RE- retículo endoplasmático; GC- grânulos corticais). a e b) aspecto geral do citoplasma (aumento 2500 e 1500X, respectivamente). c) microvilosidades eretas e

grande quantidade de retículo endoplasmático liso (aumento 20000X).d) grânulos corticais agrupados no interior do oócito (aumento 15000X).

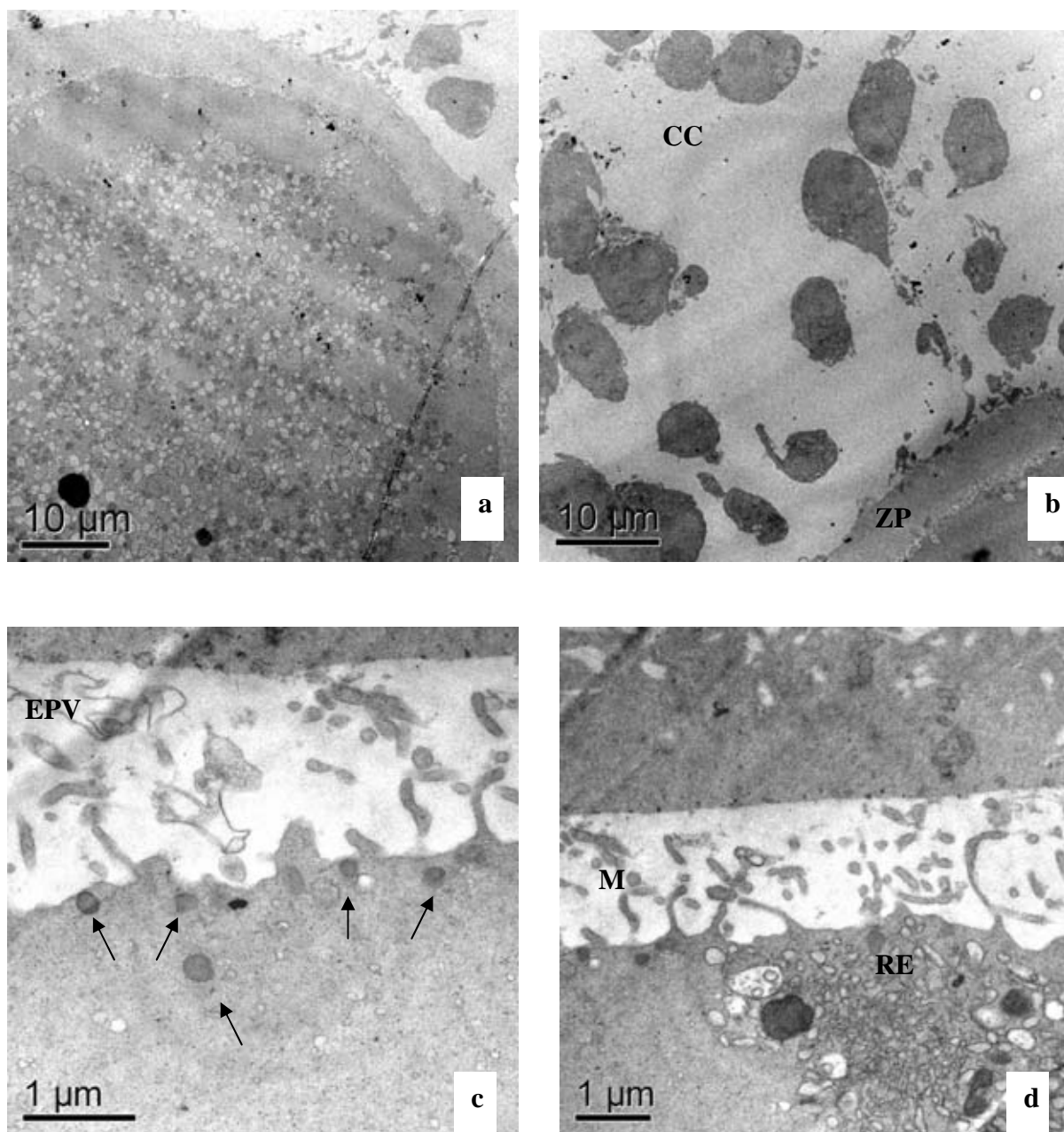


Figura 13: Características ultra-estruturais de oócitos bovinos, após tratamento G3, Alfa-MEM + PVA, do experimento 2.(CC- células do *cumulus*; EPV- espaço perivitelínico; M- microvilosidades; RE- retículo endoplasmático). a) aspecto geral do citoplasma (aumento 2000X). b) células do *cumulus* expandidas (aumento 2500X). c) grânulos corticais isolados (setas) e alinhados à membrana plasmática (aumento 20000X).d) microvilosidades eretas e grande quantidade de retículo endoplasmático liso (aumento 20000X).

## **Tratamento G2: TCM-199 +SFB + HS**

### **- Experimento 1- pré-maturação:**

Este tratamento apresentou oócitos com características de maduro, outros com características de degeneração e outros com características de célula plasmolisada. Os oócitos com características de maduro apresentaram *cumulus* expandido, membrana plasmática com microvilosidades eretas, espaço perivitelínico evidente, grânulos corticais isolados e alinhados à membrana, mitocôndrias centrais, organelas organizadas em associação formando um aspecto de teia com espaços livres de organelas e espaços com aglomerados, grande quantidade de retículo endoplasmático liso foi observada.

Os oócitos com características de morte celular apresentaram as células do *cumulus* sem expansão, a membrana plasmática não apresentou microvilosidades e tinha aspecto indefinido, o citoplasma estava repleto de substâncias amorfas, as mitocôndrias não apresentaram lamelas e se organizaram em grumos por todo o oócito, não foi observada a presença de grânulos corticais.

Os oócitos plasmolisados apresentaram uma grande retração do citoplasma. O *cumulus* sofreu uma pequena expansão, as organelas se distribuíram por todo o citoplasma, formando grupos e deixando espaços livre destas. Um grande número de vesículas também foi observado. A membrana plasmática não apresentou vilosidades e os grânulos corticais se apresentaram alinhados à membrana (figuras 14 e 15).

### **- Experimento 2- Reversão:**

Todos os oócitos analisados estavam mortos. Porém, isto se deve ao n amostral analisado (2), já que previamente foi observado que aproximadamente 30% dos COCs deste tratamento alcançaram o estágio de metáfase II.

Dos oócitos observados, um apresentou *cumulus* expandido e o outro não. As mitocôndrias não apresentaram lamelas, e se distribuíram pelo citoplasma em grupos. A membrana estava indefinida e sem vilosidades. Não foram observados grânulos corticais (figura 16).

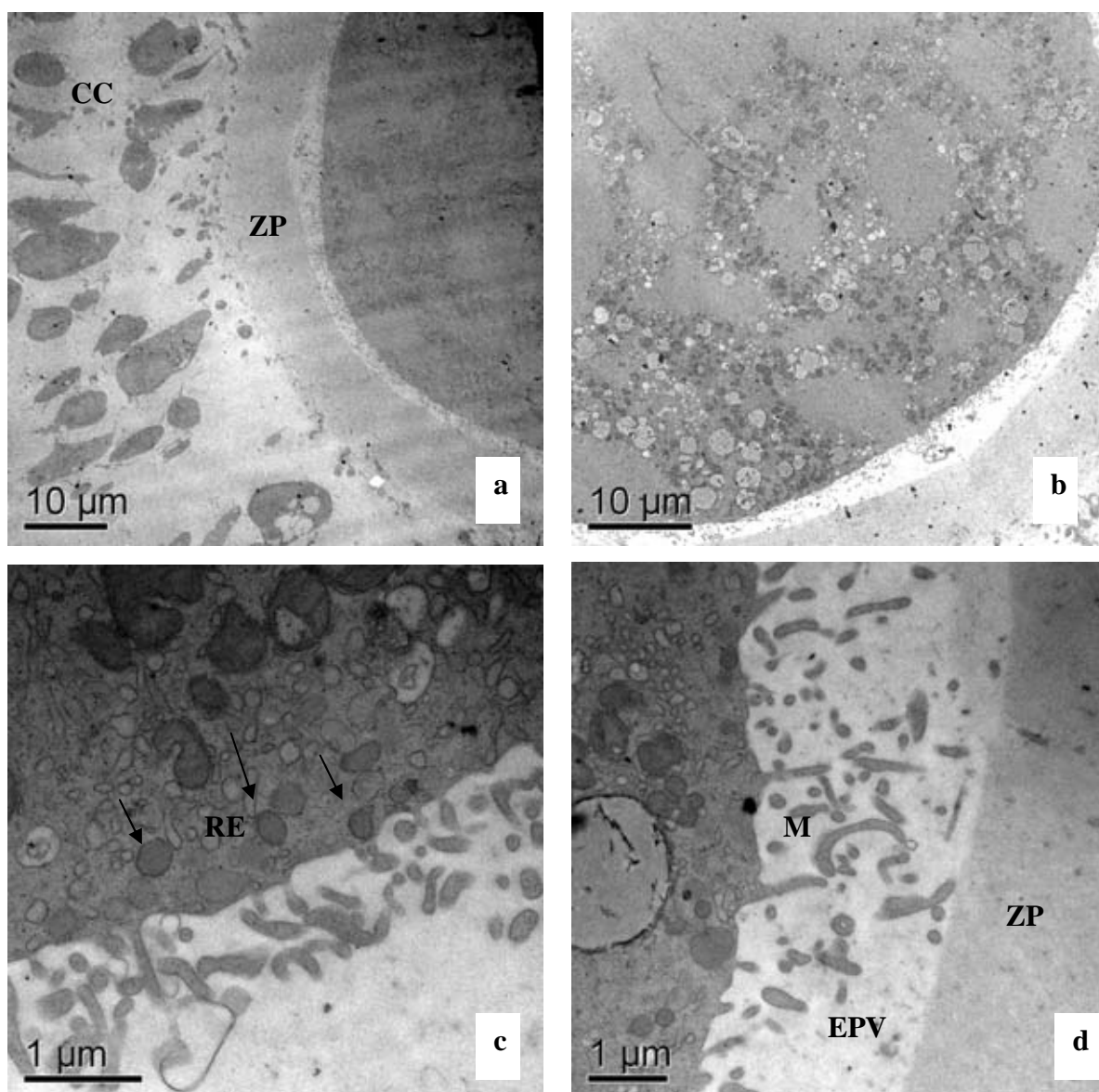


Figura 14: Características ultra-estruturais de oócitos bovinos maduros, após tratamento G2, TCM-199 +SFB + HS, do experimento 1. (CC- células do *cumulus*; ZP- zona pelúcida; RE- Retículo endoplasmático; M- Microvilosidades; EPV- espaço perivitelínico) a) células do cumulus expandidas (aumento 2000X). b) aspecto geral do citoplasma (aumento 2500X). c) grânulos corticais isolados (setas) e alinhados à membrana plasmática e grande quantidade de retículo endoplasmático liso (aumento 30000X).d) espaço perivitelínico evidente e microvilosidades eretas (aumento 20000X).

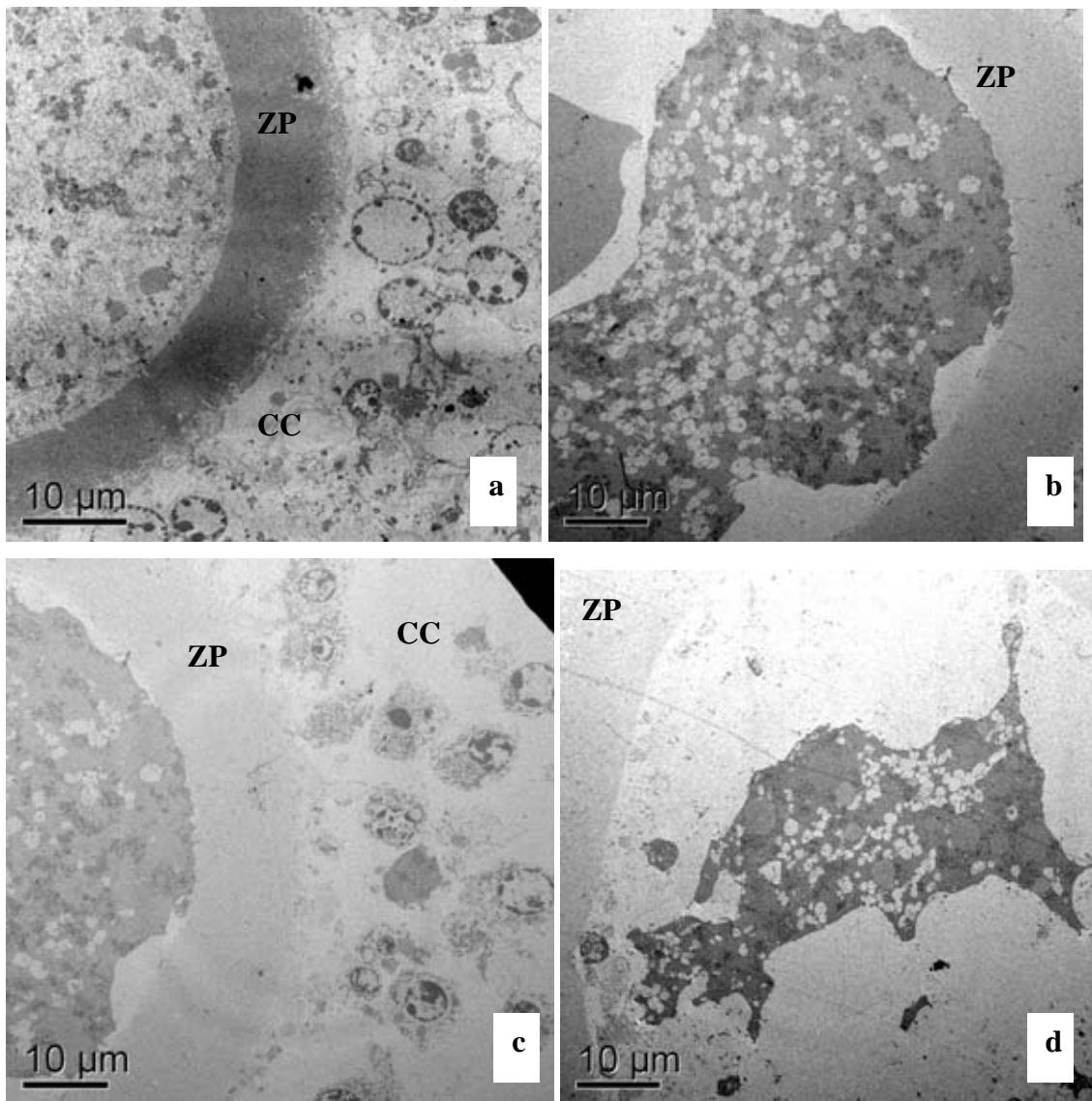


Figura 15: Características ultra-estruturais de oócitos bovinos com características de morte celular, após tratamento G2 do experimento 1, TCM-199 + HS. (ZP- Zona pelúcida; CC- Células do *cumulus*)

a) aspecto geral do citoplasma de oócito com aspecto de degeneração (aumento 2500X). b) aspecto geral do citoplasma de oócito com característica de plasmólise (aumento 2000X). c) Células do *cumulus* pouco expandidas (aumento 2000X). d) Aspecto geral do oócito plasmolisado (aumento 2000X).



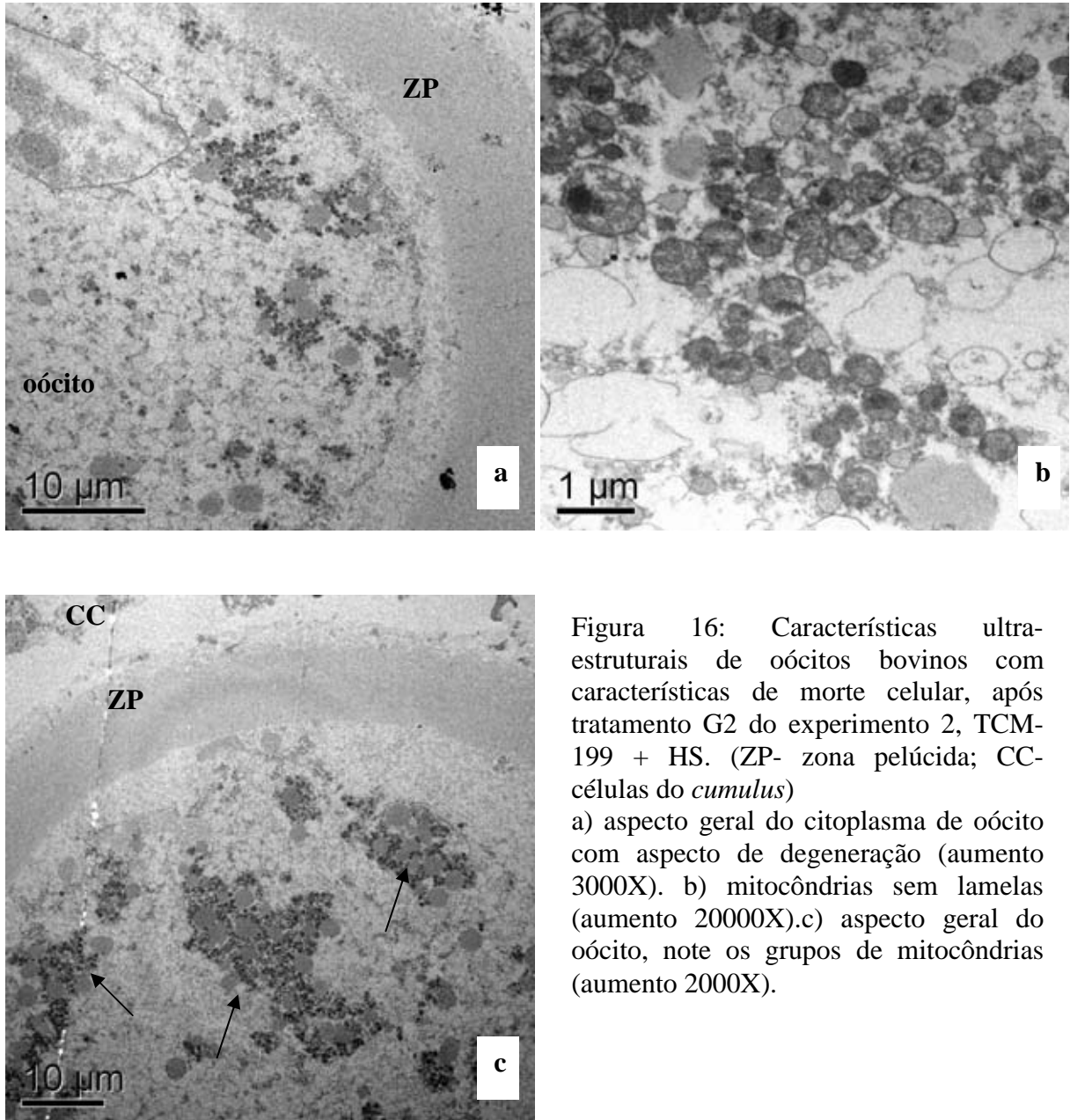


Figura 16: Características ultra-estruturais de oócitos bovinos com características de morte celular, após tratamento G2 do experimento 2, TCM-199 + HS. (ZP- zona pelúcida; CC- células do *cumulus*)

a) aspecto geral do citoplasma de oócito com aspecto de degeneração (aumento 3000X). b) mitocôndrias sem lamelas (aumento 20000X).c) aspecto geral do oócito, note os grupos de mitocôndrias (aumento 2000X).



## 6. DISCUSSÃO

### **Sistema de pré-maturação: inibição da maturação nuclear de COCs pelo co-cultivo com hemi-secções foliculares em meio definido**

Uma das principais causas da diminuição do desempenho de oócitos maturados *in vitro* é o fato destes serem retirados de folículos imaturos, e por isto, ainda não terem passado pelo processo de aquisição de competência que ocorre no final do desenvolvimento folicular, logo após o pico de LH (BREVINI-GANDOLFI e GANDOLFI, 2001; SIRARD *et al*, 2006). Por este motivo, torna-se necessário o melhoramento da técnica de MIV para permitir ao oócito se desenvolver *in vitro* de forma mimética à situação *in vivo*.

Tem sido proposto que duas etapas sejam realizadas antes da fertilização *in vitro*, uma etapa de pré-maturação, onde o oócito tem a meiose bloqueada com o objetivo de sincronizar sua maturação nuclear com a citoplasmática e, molecular e desta forma, adquirir competência para se desenvolver em embrião, seguida da etapa que é a maturação *in vitro* propriamente dita (FRANZ *et al*, 2002; LE BEAUX *et al*, 2003; MACHALKOVA *et al*, 2004).

Foote e Thibault (1969) *apud* Sirard e Coenen (1993), questionaram pela primeira vez sobre a possibilidade de usar um inibidor natural da meiose *in vitro* com este objetivo, uma vez que há a hipótese de que as células foliculares produzem um fator inibidor que mantém o oócito com a meiose bloqueada (WASSERMAN, 1994).

Neste trabalho e no experimento 1, o objetivo foi desenvolver um sistema de pré-maturação oocitária, no qual foram utilizadas hemi-secções foliculares em co-cultivo com COCs bovinos imaturos em meio definido ( $\alpha$ -MEM + PVA), comparado com o meio

tradicional (TCM-199 +SFB), utilizado como controle. O objetivo deste experimento era a indução da inibição da maturação nuclear dos COCs.

Somente no tratamento G1 (TCM-199 + SFB)- controle, foi observado a maturação nuclear de 83% dos COCs cultivados. Nos outros tratamentos, G2 (TCM-199 + SFB + HS), G3 ( $\alpha$ -MEM + PVA) e G4 ( $\alpha$ - MEM + PVA + HS) houve inibição da meiose, com 81,25%, 74,05%, 96,39%, respectivamente dos COCs permanecendo em estágio imaturo depois de 24 horas de pré-maturação.

O grupo controle se comportou da maneira esperada, pois como já é bem estabelecida, a presença de soro e FSH no meio de maturação estimulam a maturação oocitária (SANBUISSHO E THRELFALL, 1990).

Como sugerido por Foote e Thibault (1969) e posteriormente testado por vários grupos de pesquisa (GIOMETTI *et al*, 2005; RICHARD e SIRARD, 1996a; RICHARD e SIRARD, 1996b; SIRARD *et al*, 1992; SIRARD e COENEN, 1993), a maturação nuclear foi bloqueada pela presença de fatores da parede folicular durante um período de 24 horas.

Richard e Sirard (1996a) demonstram que as células da teca e não as células da granulosa são as principais atuantes no bloqueio meiótico. O fator inibitório produzido por essas células é solúvel no meio de cultivo e atuam através das células do *cumulus*.

O cultivo dos COCs em meio definido, grupo G3 ( $\alpha$ -MEM + PVA), também foi efetivo em bloquear por 24 horas a meiose como pode ser observado na figura 1 e na tabela 1. A inibição da progressão da maturação nuclear em meio definido, foi alcançada mesmo na ausência de tecido folicular, onde 74% dos COCs permaneceram imaturos. Este achado sugere que o meio de cultura definido  $\alpha$ -MEM+PVA pode apresentar fatores inibidores ou ausência de fatores estimuladores da maturação nuclear, o que leva ao bloqueio meiótico. Segundo nosso conhecimento este é o primeiro relato da literatura no qual utilizando-se hormônios (IGF-I, insulina) e suplementos como selênio e transferrina, normalmente considerados estimuladores da maturação nuclear oocitária (JEONG, 2007), que se observa a inibição desta.

Numerosos estudos relatam a importância do sistema IGF (fator de crescimento semelhante à insulina) no crescimento e desenvolvimento folicular, proliferação das células foliculares e esteroidogênese de oócitos de vacas (MONGET *et al*, 2002) e coelhas (LORENZO *et al*, 1997). A presença de IGF-I no meio de maturação promove a progressão mais rápida da meiose em oócitos de coelhas (LORENZO *et al*, 1997). Oócitos bovinos provindos de folículos pequenos ( $\leq 3$ mm), também têm a meiose induzida, no entanto o IGF-I não causa alteração na progressão da maturação nuclear de oócitos de folículos médios (3,1-

7mm) e grandes (7,1-10mm) (SAKAGUCHI *et al*, 2002). Portanto, a presença de IGF-I no meio  $\alpha$ -MEM+PVA, não influenciou tanto a maturação nuclear dos COCs cultivados, uma vez que estes foram aspirados principalmente de folículos médios.

O cultivo dos COCs em meio definido, tratamento G3, apresentou a maior concentração de E2 (2,444 ng/mL) em comparação com os outros grupos. De acordo com Beker *et al* (2002) a adição de 1  $\mu$ g/mL de E2 ao meio de maturação diminuiu significativamente a porcentagem de oócitos em metáfase II, ou seja, maduros. No entanto, quando a MIV é realizada na presença de FSH, estes efeitos são atenuados. Este dado sugere que um dos fatores promotores da inibição da progressão da meiose do grupo G3 pode ser a maior concentração de E2 presente no meio de cultivo, produzido pelas células do *cumulus*. Outro fato importante é que o meio  $\alpha$ -MEM+PVA não possui FSH em sua constituição, portanto, o efeito inibitório do E2 não foi minimizado.

É um fato bem caracterizado, que o FSH é o principal coordenador do crescimento e desenvolvimento folicular *in vivo* sendo essencial para a aquisição de competência pelo oócito. O papel do FSH na maturação é pouco entendido, mas relatos indicam que sua ação é mediada pelas células do *cumulus*. O FSH induz a produção de um sinal nas células somáticas que estimula o oócito a retomar a meiose. Trata-se portanto de um hormônio estimulatório da GVBD em COCs, mas não em oócitos desnudos (SIRARD *et al*, 2007). O fato do meio  $\alpha$ -MEM+PVA não possuir essa gonadotrofina em sua constituição, pode ser outro fator causador da inibição da progressão da meiose observada.

Este resultado mostra pela primeira vez na literatura, o efeito inibitório da maturação nuclear proporcionado por um meio de cultivo sem a adição de inibidores farmacológicos.

### **Sistema de maturação de COCs pré-maturados com HS e em meio definido: Análise do potencial de reversibilidade da inibição**

Os tratamentos G1 (TCM-199+SFB) e G3 ( $\alpha$ -MEM + PVA) apresentaram mais de 80% de COCs maduros ao final de 24 horas de cultura em meio de maturação padrão (TCM-199 +SFB). O tratamento G1 manteve a mesma porcentagem de COCs maduros em comparação ao experimento 1. O grupo G3, que no experimento 1 alcançou 74% de inibição da meiose, obteve aproximadamente 80% de reversão desta inibição após 24 horas de cultivo em meio de maturação padrão.

De acordo com os resultados do experimento 2, observa-se que dos tratamentos que tiveram a meiose inibida na pré-maturação, tratamentos G2, G3 e G4, somente o tratamento G3 ( $\alpha$ -MEM + PVA) apresentou boa taxa de reversibilidade da inibição inicial (~80%).

Observa-se no grupo G3, que após as 24 horas de cultivo em meio de maturação padrão, a concentração de E2 diminuiu 10 X em relação à concentração relatada no experimento 1, de pré-maturação, mostrando o papel inibitório do E2 na progressão da maturação nuclear oocitária (BEKER *et al*,2002; Mc GAUGHEY, 1977).

Os tratamentos G2 (TCM-199 + HS) e G4 ( $\alpha$ -MEM + PVA + HS), que passaram pela co-cultura com as HS, apresentaram baixas taxas de reversibilidade da inibição da meiose, aproximadamente 30 e 16 %, respectivamente.

Sirard e Coenen (1993), obtiveram após o co-cultivo com 1, 2 ou 5 HS, cerca de 90, 50 e 40%, respectivamente, de reversibilidade da inibição da meiose após cultivo em meio livre de inibidores, concluindo que a inibição é reversível a menos que uma grande quantidade de tecido seja colocada no co-cultivo, que pode causar injúrias ao oócito. Como no presente trabalho a taxa de reversibilidade foi menor do que a encontrada por Sirard e Coenen (1993), vale a pena lembrar que foram utilizadas 10 HS / co-cultura, ou seja uma grande quantidade de tecido folicular, que pode ter causado danos irreversíveis aos oócitos, gerando uma baixa taxa de reversibilidade. Os danos gerados pela co-cultura podem ser observados nas figuras 17,18,22 e 23, que mostram características ultra estruturais de morte celular.

Foi observado durante a realização dos experimentos que os meios de cultivo TCM-199 + SFB e  $\alpha$ -MEM + PVA mudaram de coloração após as 24 horas de co-cultura dos COCs com as HS. Esta mudança que foi da cor vermelha para o alaranjado e amarelo, respectivamente, indica a mudança de pH dos meios de cultivo, provavelmente induzida pelo cultivo das HS, para um pH mais ácido do que o indicado para o cultivo de oócitos. Palma (2001), relata que o pH dos meios de cultivo devem se manter a um valor similar ao do plasma sanguíneo, a um pH de 7,4 para o desenvolvimento de oócitos e embriões. O controle visual das variações de pH através do corante vermelho de fenol indicam que quando o meio está na cor vermelha, seu pH é de 7,4; quando alaranjado, 7,0 e amarelo, 6,5. Tal fato pode explicar o baixo potencial de reversibilidade da inibição da meiose e até mesmo a morte dos COCs ainda na pré-maturação.

Park *et al* (1999), também observaram uma baixa taxa de reversibilidade da inibição da meiose após o co-cultivo com 2 HS, no entanto, eles relacionaram esta taxa com o volume de meio de maturação utilizado durante a segunda etapa do processo, ou seja, durante o período de cultivo na ausência de inibidores. Para o volume de 0,1 mL de meio, foi detectado

que somente 13% dos COCs tiveram a meiose retomada após 12 horas de pré-maturação seguidas de 12 horas de cultivo na ausência de inibidores, enquanto que para os volumes de 0,5 e 2,0 mL, o potencial de reversibilidade subiu para 40 e 38%, respectivamente. Eles concluíram que um maior volume de meio seria capaz de diluir possíveis fatores tóxicos ao oócito, no entanto, como a porcentagem de oócitos maduros não aumentou com o aumento do volume de 0,5 para 2,0 mL, novos estudos são necessários para este esclarecimento.

Levando em consideração as conclusões de Sirard e Coenen (1993) e Park *et al* (1999), pode-se sugerir que o potencial de reversibilidade de inibição da meiose depende da relação quantidade de tecido folicular : volume de meio de cultivo.

No tratamento G4 ( $\alpha$ -MEM + PVA + HS), cuja taxa de reversibilidade foi a menor observada entre os grupos testados (~16%), vale a pena ressaltar que além da inibição causada pela presença das HS, ainda houve a inibição induzida pelo meio de cultivo  $\alpha$ -MEM +PVA que pode ter provocado uma inibição da meiose muito intensa ao ponto de ocasionar danos à maquinaria dos oócitos, impedindo-os de retomar a meiose e levando-os à morte.

### **Determinação da concentração de 17 $\beta$ estradiol (E2) e Progesterona (P4) nos meios de cultura referentes aos experimentos 1 e 2.**

A determinação da concentração dos dois principais hormônios da via biossintética de esteróides ovarianos, 17 $\beta$  Estradiol (E2) e Progesterona (P4), teve o objetivo de analisar o comportamento funcional das células foliculares da HS e das células do *cumulus* durante os cultivos em meio tradicional e definido, e o papel do oócito imaturo/pré-maturação e maduro sobre a produção destes esteróides.

#### **- Sistema de pré-maturação**

Foi observado que o tratamento G3 ( $\alpha$ -MEM + PVA) apresentou a concentração de E2 significativamente maior do que os outros tratamentos, como pode ser visto na tabela 3, o que indica que as células do *cumulus* e não as células da HS são as principais secretoras de E2 durante o período de cultivo em meio definido. Corroborando com os resultados prévios encontrados por Montrezor *et al* (2002) e Piccinato *et al* (2002), sugere-se que o sistema de cultivo  $\alpha$ -MEM + PVA é capaz de manter ativa a capacidade estrogênica das células cultivadas, criando um ambiente condizente com a etapa de desenvolvimento no qual o oócito se encontra, ou seja, durante a sua maturação.

Estudos sugerem que oócitos que geram prenhez, ou seja, oócitos que adquirem competência após os procedimentos *in vitro* são principalmente aqueles que foram cercados por um ambiente com alta concentração de E2 (ANDERSEN, 1993 *apud* LORENZO *et al*, 1997).

Os resultados obtidos por Lorenzo *et al* (1997) mostram que a presença de IGF-I no meio de maturação *in vitro*, leva ao aumento da produção de E2 e ao aumento da relação E2: andrógenos. Tal relação é associada com oócitos saudáveis, uma vez que *in vivo* o ambiente folicular do folículo pré-ovulatório é caracterizado por alta concentração de E2 (DIELEMAN *et al*, 1983).

Uma vez que o correto balanço dos esteróides intra-foliculares é um pré-requisito para o padrão normal de síntese protéica durante a maturação de oócitos de mamíferos (OSBORN e MOOR, 1983 *apud* ASSEY *et al*, 1994), um ambiente que mimetiza *in vitro* as condições apropriadas para a aquisição de competência oocitária é de extrema importância para possivelmente melhorar a taxa de produção de embriões *in vitro*.

O tratamento G4,  $\alpha$ -MEM + PVA + HS, no entanto, apresentou uma baixa capacidade estrogênica em relação ao tratamento G3,  $\alpha$ -MEM + PVA, cerca de 1/10 desta. Isto pode decorrer do fato que os oócitos do tratamento G4 ( $\alpha$ -MEM + PVA + HS) começaram a morrer devido à grande inibição induzida tanto pelas células da HS, quanto pelo próprio meio de cultivo, o que refletiu na produção hormonal.

O potencial papel do oócito na regulação da esteroidogênese folicular foi primeiramente sugerida por El-Fouly *et al* (1970), no entanto, outros autores como Vanderhyden e Macdonald (1998) também relatam que a produção hormonal das células da granulosa durante a foliculogênese é modulada pelo oócito, sendo que este envia para as células somáticas um inibidor da produção de progesterona em quantidade crescente de acordo com o estágio de desenvolvimento folicular. Este fator inibidor parece influenciar a fisiologia celular de maneira a reduzir a habilidade das células produzirem ou acumularem progesterona mesmo na presença de quantidade suficiente de substrato. Esta inibição ocorre pelo fato do inibidor secretado pelo oócito alterar a quantidade das enzimas da via da esteroidogênese, dentre elas a aromatase e a P450-scc e/ou  $3\beta$ -HSD. Portanto, como os oócitos dos tratamentos G2 (TCM-199 + SFB + HS) e G4 ( $\alpha$ -MEM + PVA + HS) sofreram lesões que os levaram à morte, como observado pelas características ultra-estruturais (figuras 17, 18, 22 e 23), pode-se deduzir que este fato foi determinante para a luteinização das células

do *cumulus* e conseqüentemente aumento da produção de progesterona observado nos tratamentos G2 e G4 (Figura 12 e tabela 3).

O tratamento G2 (TCM-199 + SFB + HS) apresentou a maior concentração de P4 (77,87 ng/mL) observada. Esta alta produção de P4 pode ser explicada ainda por este tratamento utilizar soro em sua constituição, causando assim luteinização das células foliculares (GUTIÉRREZ *et al*, 1997).

No grupo experimental G1 (TCM-199 + SFB), também foi observada alta concentração de progesterona, mostrando que sistemas de cultivo que utilizam soro em sua constituição causam a luteinização das células cultivadas (GUTIÉRREZ *et al*, 1997), o que não é interessante pelo fato de ser uma etapa que deveria ocorrer somente após a maturação do oócito, onde o folículo ovariano durante a ovulação *in vivo* é caracterizado por uma alta concentração de E2 e um oócito bloqueado na Prófase I. Somente quando esta concentração de E2 atinge valores máximos é que o pico ovulatório de LH é desencadeado e conseqüentemente o oócito retoma a meiose e as células da granulosa são luteinizadas, ou seja, secretam P4 (ESPEY e LIPNER, 1994). Silva e Knight (2000), relatam que a adição de P4 em concentração fisiológica semelhante a observada em folículos pré-ovulatórios, ao meio de maturação provocam redução na competência para o desenvolvimento após a clivagem.

#### **-Sistema de maturação de COCs pré-maturados com HS e em meio definido**

A determinação da concentração dos esteróides E2 e P4 após as 24 horas de pré-maturação seguidas de 24 horas de cultivo em meio de maturação padrão, mostra que a capacidade esteroidogênica diminuiu bastante em comparação ao experimento de pré-maturação, com exceção à produção de P4 pelo grupo G3 ( $\alpha$ -MEM+PVA), que aumentou (tabelas 3 e 4).

Observa-se que a concentração de E2 foi cerca de 7 vezes maior no grupo G3 ( $\alpha$ -MEM+PVA), pré-maturado em meio definido, do que no grupo G2 (TCM-199+SFB+HS), que foi pré-maturado em meio padrão. Portanto, nota-se que a capacidade esteroidogênica continuou maior nos COCs pré-maturados em meio definido, mesmo depois do cultivo destes em meio padrão. Sugere-se então, que a pré-maturação em meio definido  $\alpha$ -MEM+PVA, promoveu uma maior viabilidade celular, demonstrada pela capacidade de produção de esteróides mesmo quando os COCs foram posteriormente cultivados em meio padrão.

O aumento da produção de P4 no grupo G3, corrobora com o fato que o cultivo de células foliculares em meio que possui soro em sua constituição leva à luteinização destas

(GUTIÉRREZ *et al*, 1997). Este aumento da concentração de P4 após a pré-maturação num ambiente rico em E2 é similar ao que acontece *in vivo* (DIELEMAN *et al*, 1983).

Os grupos G2 e G4, que foram pré-maturados na presença de HS foram os que apresentaram menor produção de esteróides. Sugere-se que esta menor produção seja devida à morte dos oócitos, já que estes são os principais regentes da esteroidogênese (VANDERHYDEN e MACDONALD, 1998).

### **Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) para avaliação da maturação citoplasmática de COCs provenientes dos experimentos de pré-maturação (1) e reversão (2).**

Resumidamente, a maturação oocitária refere-se aos processos de redução do material genético pela metade, que é a meiose ou maturação nuclear, e a maturação citoplasmática, que trata da síntese de mRNAs e proteínas e do rearranjo das organelas do oócito. Tais eventos conferem ao oócito a capacidade de ser fertilizado e progredir até embrião, ou seja, adquirir competência. (PINCTON, 1998; SIRARD *et al*, 2006).

Pela primeira vez a ultra-estrutura de oócitos co-cultivados com HS foliculares é analisada. Os resultados deste trabalho, demonstram que o compartimento citoplasmático foi muito influenciado pelos tratamentos de pré-maturação.

COCs fixados assim que foram aspirados, ou seja, no tempo zero, e COCs cultivados por 24 horas em meio de maturação padrão, foram tomados como controle (imaturo e maduro, respectivamente).

COCs do tempo zero apresentaram características tais como células do *cumulus* sem expansão, microvilosidades grandes e deitadas, grumos de grânulos corticais no interior do oócito, distribuição cortical das mitocôndrias, ausência de espaço perivitelínico, as quais são características de COCs imaturos (ASSEY *et al*, 1994; FOULADI-NASHTA e CAMPBELL, 2006; HYTTEL *et al*, 1997).

COCs cultivados por 24 horas em meio de maturação padrão apresentaram expansão do *cumulus*, espaço perivitelínico desenvolvido, microvilosidades menores e eretas, distribuição das mitocôndrias por todo o citoplasma e grânulos corticais isolados e alinhados à membrana plasmática, características de maturação (ASSEY *et al*, 1994; FOULADI-NASHTA e CAMPBELL, 2006; HYTTEL *et al*, 1997).

O tratamento G4 ( $\alpha$ -MEM + PVA + HS) apresentou características de morte celular (Figura 17) tais como citoplasma granulado, que impossibilitou a observação das organelas,



membrana plasmática indefinida e sem vilosidades e mitocôndrias sem cristas. De acordo com os resultados da avaliação da maturação nuclear, este tratamento proporcionou aproximadamente 96% de inibição da progressão da meiose, deixando os oócitos no estágio imaturo (Figura 1 e Tabela 1). Com base nestes resultados, sugere-se que o processo inibitório foi tão intenso a ponto de causar injúrias irreversíveis ao oócito, que o levaram à morte, pois além da inibição causada pela HS (SIRARD *et al*, 1992), também foi observado que o meio de cultivo  $\alpha$ -MEM + PVA proporciona inibição da maturação (Figura 1 e Tabela 1).

Uma vez que o processo inibitório induzido pelo experimento 1 (pré-maturação) não foi revertido no experimento 2 (reversão) com êxito, cerca de 80% dos COCs permaneceram no estágio imaturo, e que as características ultra-estruturais dos COCs deste tratamento no experimento 2 também mostraram características de morte celular, sugere-se que a maioria COCs morreram ainda na pré-maturação, devido ao intenso processo inibitório promovido pela HS somado ao efeito inibitório induzido pelo meio de cultivo.

No tratamento G2 (TCM -199 + SFB + HS), foram encontradas três morfologias ultra-estruturais distintas, isto, devido ao fato deste tratamento ter apresentado cerca de 80% de inibição da progressão da meiose, 11% de oócitos maduros e 7% de oócitos no estágio intermediário da meiose (Tabela 1 e Figura 1).

Foi encontrada a ultra-estrutura referente a um oócito maduro, com expansão do *cumulus*, grânulos corticais isolados e alinhados à membrana plasmática e distribuição das mitocôndrias por todo o citoplasma (DIEZ *et al*, 2005; HYTTEL *et al*, 1997) características que evidenciam o processo de maturação citoplasmática. Mas também foram encontrados oócitos com características ultra-estruturais de morte celular semelhante às encontradas no tratamento G4 ( $\alpha$ -MEM + PVA + HS) e características de célula plasmolisada, onde foi possível observar que houve o início da migração mitocondrial (Figuras 21 e 22), o que sugere que o processo inibitório deve ter sido danoso ao oócito, porém de forma menos acentuada que no tratamento G4, já que sua taxa de inibição foi significativamente menor do que a taxa de inibição do tratamento G4.

No experimento 2 (reversão) somente foram observadas características de morte celular, devido ao n amostral observado. Somente 2 COCs deste tratamento (TCM + SFB + HS) foram analisados. Porém, como pode ser observado na figura 23 a,c, houve migração mitocondrial antes da morte celular, o que sugere que pode se tratar de um oócito que não teve a meiose inibida previamente e, portanto sofreu uma hiper-maturação que o levou a morte, ou mesmo de um oócito que teve a meiose reiniciada após a inibição, mas que devido a danos causados pelo processo inibitório não sobreviveu.

O tratamento G3 ( $\alpha$ -MEM + PVA) mostrou resultados bem interessantes, já que apresentou uma alta taxa de inibição da maturação nuclear (~74%) e alta taxa de reversibilidade desta inibição (~80%). O resultado da análise ultra-estrutural foi bem promissor, uma vez que foi observado no experimento 1 (pré-maturação), algumas características de maturação citoplasmática, tais como início da migração mitocondrial para o interior do oócito e a presença de microvilosidades eretas (ASSEY *et al*, 1994; DIEZ *et al*, 2005; HYTTEL *et al*, 1997).

Os resultados do experimento 2 (reversão) mostram que os COCs deste tratamento (G3) terminaram o processo de maturação citoplasmática, apresentando grânulos corticais isolados e alinhados à membrana plasmática, áreas próximas ao córtex sem organelas e o término da migração mitocondrial para o interior, mostrando que além da reversão da inibição nuclear, a maturação citoplasmática chegou a termo.

De acordo com Fouladi-Nashta e Campbell (2006), folículos cultivados por 24 horas em meio suplementado com 5 $\mu$ g/mL de insulina, tiveram a maturação citoplasmática promovida, inclusive com a migração dos grânulos corticais para a região periférica do oócito, sendo estes dispostos em alinhamento com a membrana e de forma isolada. No entanto, Fouladi-Nashta e Campbell (2006) não observaram mudança na taxa de produção de blastocistos em relação ao controle, talvez devido à hipermaturação pela qual os oócitos passaram. No entanto, no presente trabalho, foi utilizada uma dose bem menor de insulina, que promoveu apenas o início do processo de maturação citoplasmática. Portanto, são necessários estudos adicionais para analisar se esta pré-maturação citoplasmática promovida pelo meio de cultivo irá promover o aumento da taxa de produção de embriões *in vitro*.

## 7. CONCLUSÃO

Pela primeira vez na literatura é demonstrado o grande potencial de inibição da maturação nuclear de um meio de cultura definido ( $\alpha$ -MEM+PVA) (G3), por um período de 24 h, sem causar danos aos oócitos que os impossibilitem de reverter o processo inibitório.

O co-cultivo de hemi-seções foliculares e COCs bovinos imaturos promoveu a inibição da meiose, porém este processo inibitório não foi revertido com êxito.

A inibição da meiose alcançada pelo cultivo dos COCs em  $\alpha$ -MEM+PVA proporcionou o início da maturação citoplasmática ainda no período de pré-maturação, sendo este acontecimento de grande valor, pois desta forma acredita-se que haja uma maior sincronização da maturação como um todo. Este sistema, no qual a pré-maturação foi realizada em meio definido, seguida da maturação em meio tradicional, proporcionou um ambiente de maturação oocitária similar ao que acontece *in vivo*, de acordo com o resultado da determinação da concentração de esteróides.

Portanto, sugere-se que o sistema de pré-maturação de COCs bovinos imaturos em meio  $\alpha$ -MEM + PVA seguido do cultivo destes em meio de maturação padrão seja um bom sistema para o estudo dos mecanismos que ocorrem durante a maturação oocitária.

## 8. REFERÊNCIAS

ADONA, P.R.; PIRES, P.R.L.; QUETGLAS, M.D.; 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. **Animal Reproduction Science**, doi:10.1016/j.anireprosci.2007.06.013, 2007a.

ADONA, P.R.; PIRES, P.R.L.; QUETGLAS, M.D.; LEAL, C.L.V. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Animal Reproduction Science**, doi:10.1016/j.anireprosci.2007.07.002, 2007b.

ALI, A.; COENEN, K.; BOUSQUET, D.; SIRARD, M.A. Origin of bovine follicular fluid and its effect during *in vitro* maturation on the developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, 62: 1596-1606, 2004.

ALI, A.; SIRARD, M.A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**, 66: 901-905, 2002.

ANDERSEN, C.Y. Characteristics of human follicular fluid associated with successful conception after *in vitro* fertilization. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, 77: 1227-1234, 1993. *apud* LORENZO, P.L.; ILLERA, J.C.; SILVÁN, G.; MUNRO, C.J.; ILLERA, M.J.; ILLERA, M. Steroid-level response to insulin-like growth factor-1 in oocytes matured *in vitro*. **Journal of Reproduction Immunology**, 35:11-29, 1997.

ARLOTTO, T.; SCHUARTZ, J.L.; FIRST, N.L.; LEIBFRIED RUTLEDGE, M.L. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, 55: 1303-1322, 1996.

ASSEY, R.J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; PURWANTARA, B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. **Molecular Reproduction and Development**, 37: 335-344, 1994.

- AVERY, B.; HAY-SCHMIDT, A.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Embryo development, oocyte morphology, and kinetics of meiotic maturation in bovine oocytes exposed to 6-DMAP prior to in vitro maturation. **Molecular Reproduction and Development**, 50: 334-344, 1998.
- AYOUB, M.A.; HUNTER, A.G. Inhibitory effect of bovine follicular fluid on in vitro maturation of bovine oocytes. **Journal of Dairy Science**, 76: 95–100, 1993.
- BEKER, A.R.C.L.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. Effect of 17 $\beta$ -estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, 58: 1663-1673, 2002.
- BILODEAU, S.; FORTIER, M.A.; SIRARD, M.A. Effect of adenylate cyclase stimulation on meiotic resumption and cyclic AMP content of zona-free and cumulus-enclosed bovine oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, 97: 5-11, 1993.
- BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, 41: 54-62, 1995.
- BREVINI, T.A.; CILLO, F.; ANTONINI, S.; GANDOLFI, F. Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. **Animal Reproduction Science**, 98: 23-38, 2007.
- BREVINI-GANDOLFI, T.A.; FAVETTA, 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. **Molecular Reproduction and Development**, 52: 427-433, 1999.
- BYSKOV, A.G.; ANDERSEN, C.Y.; HOSSAINI, A.; GUOLIANG, X. Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulated with FSH. **Molecular Reproduction and Development**, 46: 296-305, 1997.
- CAMPBELL, B. K. Inhibin oestradiol and progesterone production by ovine granulosa cells *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series 3 Abstract 37**, 1989.
- CAMPBELL, B. K.; SCARAMUZZI, R. J.; WEBB, R. Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. **Journal of Reproduction and Fertility**, 106:7-16, 1996.
- CHERYL, L.A.; GITTENS, J.E.I.; O'BRIEN, M.J.; EPPIG, J.J.; KIDDER, G.M. Intercellular communication via connexin 43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. **Developmental Biology**, 233: 258-270, 2001.
- COLLARES, C.V.A. ; ROSA E SILVA, A. A. M. . Granulosa cells culture in chemically defined medium: Is there mimicry between those cells and the cells of dominant follicle and/or preovulatory follicle. **Biology of Reproduction**, 68: 319-320, 2003.
- COLEMAN, N.V.; SHAGIAKHMETOVA, G.A.; LEBEDEVA, I.Y.; KUZMINA, T.I.; GOLUBEV, A.K. In vitro maturation and early developmental capacity of bovine oocytes cultured in pure follicular fluid and supplementation with follicular wall. **Theriogenology**, 67: 1053-1059, 2007.

CRAN, D.G. Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility**, 38: 49-62, 1989.

CROZET, N.; KANKA, J.; MOTLIK, J.; FULKA, J. Nucleolar fine structure and RNA synthesis in bovine oocytes from antral follicles. **Gamete Research**, 14: 65-73, 1986.

DAI, Y.; LEE, C.; HUTCHINGS, A.; SUN, Y.; MOOR, R. Selective requirement for cdc25c protein synthesis during meiotic progression in porcine oocytes. **Biology of Reproduction**, 62: 519-532, 2000.

DEDIEU, T.; GALI, L.; CROZET, N.; SEVELLEC, C.; RUFFINI, S. Mitogen- activated protein kinase during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. **Molecular Reproduction and Development**, 45: 351-358, 1996.

DEKEL, N.; Beers, W.H.. Rat oocyte maturation in vitro: relief of cyclic AMP inhibition by gonadotropins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 75:4369-4373, 1978.

DEKEL N. Proteinphosphorilation/ dephosphorilation in the meiotic cell cycle of 4 mammalian oocytes. **Reviews of Reproduction**, 1: 82-88, 1997.

DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology** 234:19-25, 2005.

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. **Developmental Biology**, 86: 356-362, 1981.

DE LOOS, F.; VAN VLIET, C.; VAM MAURIK, P.; KRUIP, T.A.M. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, 24: 197-204, 1989.

DE SOUZA, P.A.; WATSON, A.J.; SCHULTZ, G.A. *et al.* Oogenic and zygotic gene expression directing early bovine embryogenesis: a review. **Molecular Reproduction and Development**, 51: 112-121, 1998.

DE VANTERY, C.; GAVIN, A.C.; VASSALLI, J.D.; SCHORDERET-SLATKINE, S. An accumulation of p34 cdc2 at the end of mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. **Developmental Biology**, 174: 335-344, 1996.

DIELEMAN, S.J.; KRUIP, T.A.; FONTIJNE, P.; DE JONG, W.H.; VANDER –WEYDEN, G.C. Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. **Journal of Endocrinology**, 97: 31-42, 1983.

DIEZ, C.; DUQUE, P.; GÓMEZ, E.; HIDALGO, C.O.; TAMARGO, C.; RODRIGUES, A.; FERNÁNDEZ, L.; DE LA VARGA, S.; FERNÁNDEZ, A.; FACAL, N.; CARBAJO, M. **Theriogenology**, 64: 317-333, 2005.

- DODE, M.A.N.; ADONA, P.R. Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-DMP. **Animal Reproduction Science**, 65: 171-180, 2001.
- DOSTAL, J.; PAVLOK, A. Isolation and characterization of maturation inhibiting compound in bovine follicular fluid. **Reproduction Nutrition Development**, 36 :681–690, 1996.
- DOWNS, S.M. The influence of glucose, cumulus cells, and metabolic coupling on ATP levels and meiotic control in the isolated mouse oocyte. **Developmental Biology**, 167: 502-512, 1995.
- DOWNS, S.M.; DANIEL, S.A.J.; BORNSLAEGER, E.A.; HOPPE, P.C.; EPPIG, J.J. Maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes by purines: modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity. **Gamete Research**, 23: 323–334, 1989.
- DOWNS, S.M.; HUNZICKER-DUNN, M. Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte cumulus cell complex by site selective analogs of cyclic adenosine monophosphate. **Developmental Biology**, 172:72-85, 1995.
- EDWARDS, R.G. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus, monkey and human ovarian oocytes. **Nature**, 208: 349-351, 1965.
- EL-FOULY, M.A.; COOK, B.; NEKOLA, M.; NALVANDOV, A.V. Role of the ovum in follicular luteinization. **Endocrinology**, 87: 288-293, 1970.
- EPPIG, J.J. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. **BioEssays**, v. 13, p. 569-574, 1991.
- ESPEY, L.L.; LIPNER, H. Ovulation. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. The physiology of reproduction. 2° Edição. Nova York: Raven Press, 1994, volume 1, capítulo 11, 571-627.
- FABBRI, R.; PORCU, E.; MARSELLA, T. *et al.* Oocyte cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 13 (4), p. 98-107, 1998.
- FAIR, T.; HULSHOF, S.; HYTTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, 46: 208-215, 1997.
- FAIR, T.; HYTTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, 42: 437-442, 1995.
- FAIR, T.; HYTTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleolus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, 43: 503-512, 1996.
- FARIN, C.E. ; YANG, L. Inhibition of germinal vesicle breakdown in bovine oocytes by DRB. **Molecular Reproduction and Development**, 37: 284-292, 1994.

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

FOOTE, W.D.; THIBAUT, C. Recherches expérimentales sur la maturation *in vitro* des ovocytes de truie et de veau. *Am Biol Anim Bioch Biophys*. 3: 329-349, 1969. *apud* Sirard MA, Coenen K, Bilodeau S. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**. 37: 39-57, 1992.

FOULADI-NASHTA, A.A.; CAMPBELL, K.H.S. Dissociation of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation by the addition of insulin in cultured bovine antral follicles. **Reproduction**, 131: 449-460, 2006.

FRANZ, L.C.; SQUIRES, E.L.; RUMPF, R.; DODE, M.A.N.; SEIDEL Jr, G.E. Effects of roscovitine in maintaining meiotic arrest in equine oocytes and subsequent maturation rates after inhibition. **Theriogenology**, 58: 679-683, 2002.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells**. A Manual of Basic Technique. Fourth Edition, 600 p, 2000.

FULKA, J. JR.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; FIRST, N.L. Effect of 6-DMP on germinal vesicle breakdown of bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, 29: 379-384, 1991.

FULKA, J. JR.; MOTLIK, J.; FULKA, J.; JILEK, F. Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, 77 :281-285, 1986.

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

GAUTIER, J.; NORBURRY, 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**, 54: 433-439, 1988.

GIBBONS, J.; SEZEN, A.; RZUCIDLO, J.; MIYOSHI, K.; WALTENBURG, R. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. **Biology of Reproduction**, 66: 895-900, 2002.

GIOMETTI, I.C.; BERTAGNOLLI, A.C.; ORNES, R.C.; DA COSTA, L.F.S.; CARAMBULA, S.F.; REIS, A.M.; OLIVEIRA, J.F.C.; EMANUELLI, I.P.; GONÇALVES, P.B.D. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, 63: 1014-1025, 2005.

GONG, J. G.; MC BRIDE, D. M.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. W. Effects of recombinant bovine somatotrophin insulin-like Growth factor-1 and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis *in vitro*. **Journal of Endocrinology**, 143:157-164,1994.

GORDO, A.C.; HE, C.L.; SMITH, S.; FISSORE, R. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology and maintenance of maturation



promoting factor activity in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, 59: 106-114, 2001.

GREENWALDG.S.;ROY, S. Follicular development and its control. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. The physiology of reproduction. 2<sup>o</sup> Edição. Nova York:Raven Press, 1994, p. 629-724.

GUTIÉRREZ, C. G.; CAMPBELL, K.; WEBB, R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle- stimulating hormone, and morphological characteristics. **Biology of Reproduction**, 56: 608-616, 1997.

HANUKOGLU, I. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology** , 43:779-804, 1992.

HAZELEGER, N.L.; HILL, D.J.; STTUBLINGS, R.B.; WALTON, J.S. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. **Theriogenology**, 43: 509-522, 1995.

HENDRIKSEN, P.J.M.; VOS, P.L.A.M.; *et al.* Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. **Theriogenology**, 53: 11 -20, 2000.

HOCCHI, S.; ITO, K.; HIRABAYASHI, M. *et al.* Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes. **Theriogenology**, 49 :787-796, 1998.

HUNTER, A. G.; MOOR, R.M. Stage dependent effects of inhibiting RNA and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes in vitro.**Journal of Dairy Science**, 70: 1646-1651, 1987.

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

ILLERA, M. Steroid-level response to insulin-like growth factor-1 in oocytes matured in vitro. **Journal of Reproduction Immunology**, 35:11-29, 1997.

ITO, M.; IWATA, H.; KITAGAWA, M.; KON, Y.; KUWAYAMA, T.; MONJI, Y. Effect of follicular fluid collected from various diameter follicles on the progression of nuclear maturation and developmental competence of pig oocytes. **Animal Reproduction Science**. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.06.003.2007.

JEONG, Y.W. *et al*, Effects of insulin–transferrin–selenium in defined and porcine follicular fluid supplemented IVM media on porcine IVF and SCNT embryo production. **Animal Reproduction Science**, doi:10.1016/j.anireprosci.2007.03.021,2007.

JESSUS, C.; RIME, H.; HACCARD, O.; VAN LINT, J.; GORIS, J.; MERLEVEDE, W.; OZON, R. Tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and p42 during meiotic maturation of Xenopus oocyte. Antagonist action of okadaic acid and 6-DMAP. **Development**, 111: 813-820, 1991.

- JOSEFSBERG, L.B.; GALIANI, D.; DANTES, A.; AMSTERDAM, A.; DEKEL, N. The proteasome is involved in the first metaphase to anaphase transition of meiosis in rat oocytes. **Biology of Reproduction**, 62:1270-1277,2000.
- JOSEFSBERG, L.B.; GALIANI, D.; LAZAR, S.; KAUFMAN, O.; SEGER, R.; DEKEL, N. MPF governs MAPK activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. **Biology of Reproduction**, 68:1282-1290, 2003.
- KACINSKIS, M.A.; LUCCI, C.M.; LUQUE, M.C.A.; BÁO, S.N. Morphometric and ultrastructural characterization of Bos indicus preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, 87: 45-57, 2005.
- KALOUS, J.; SUTOVSKY,P.; RIMKEVICOVA, Z.; SHIOYA, Y.; LIE, B.L.; MOTLIK, J. Pig me,brana-granulosa cells prevent resumption of meiosis in cattle oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, 34: 58-64, 1993.
- KASTROP, P.M.M.; BEVERS, M.M.; DESTRÉE, O.H.J.; KRUIP, T.A.M.; Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, 90: 305-310,1990.
- KASTROP, P.M.; BEVERS, M.M.; DESTREE, O.H.; KRUIP, T.A.M. Protein synthesis and phosphorylation patterns of bovinr oocytes maturing in vivo. **Molecular Reproduction and Development**, 29: 271-275, 1991.
- KASTROP, P.M.; HULSHOF, S.C.J.; BEVERS, M.M.; DESTREE, O.H.J.; KRUIP, T.A.M. The effects of  $\alpha$ -amanitin and cycloheximide on nuclear progression, protein synthesis, and phosphorylation during bovine oocyte maturation in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, 28:249-254, 1991b.
- KRUIP, T.; CRAN, D.; VAN BENEDEN, T.; DIELEMAN, S. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vitro. **Gamete Research**, 8: 29-47, 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. **Gamete Research**, 19: 423-431, 1988.
- LANGHOUT, D. J.; SPICER, L. J. AND GEISERT, R. D. Development of a culture system for bovine granulosa cells: effects of growth hormone, estradiol and gonadotrophins on cell proliferation steroidogenesis and protein synthesis. **Journal of Animal Science**,69: 3321-3334, 1991.
- LANUZA, G.M.; FICHIMAN, M.L.; BARAÑAO, J.L. Growth promoting activity oocytes on granulose cells is decreased upon meiotic maturation. **Developmental Biology**, 197: 129-139, 1998.
- LE BEAUX, G.; RICHARD, F.J.; SIRARD, M.A. Effect of cycloheximide, 6-DMAP, roscovitine and butyrolactone I on resumption of meiosis in porcine oocytes. **Theriogenology**, 60: 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. **Biology of Reproduction**, 71: 425-431, 2004.
- LEVESQUE, J.T.; SIRARD, M.A. Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, 55: 1427-1436, 1996.
- LONERGAN, P.; DINNYÉS, A.; FAIR, T.; YANG, X.; BOLAND, M. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. **Molecular Reproduction and Development**, 57: 204-209, 2000.
- LONERGAN, P.; KHATIR, H.; CAROLAN, C.; MERMILLOD, P. Bovine blastocyst production in vitro after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. **Journal of Reproduction and Fertility**, 109: 355-365, 1997.
- LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D. *et al.* Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, 37: 48-53, 1994.
- LORENZO, P.L.; ILLERA, J.C.; SILVÁN, G.; MUNRO, C.J.; ILLERA, M.J.; ILLERA, M. Steroid-level response to insulin-like growth factor-1 in oocytes matured in vitro. **Journal of Reproduction Immunology**, 35:11-29, 1997.
- MACHALKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOSEKOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, 61: 329-335, 2004.
- MARTUS, N.S.; FARIN, C.E. Effectiveness of DRB for inhibiting germinal vesicle breakdown in bovine oocytes. **Theriogenology**, 42: 1295-1302, 1994.
- MAYES, M. Granulosa cells reverse the inhibitory effect of theca cell monolayers on the maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. 2002. Tese de doutorado disponível em <http://www.theses.ulaval.ca/2002/20201/20201-4.html>, acessado dia 29 de novembro de 2007. Faculdade de Agricultura e Alimentação da Universidade de Laval, Quebec, 2002.
- Mc GAUGHEY, R.W. The culture of pig oocytes in minimal médium, and the influence of progesterone and estradiol-17 $\beta$  on meiotic maturation. **Endocrinology**, 100:39-45, 1977.
- Mc KIERNAN, S.H.; BAVISTER, B.D. Different lots of bovine serum albumin inhibit or stimulate in vitro development of hamster embryos. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, 28 A: 154-156, 1992.
- MEIJER, L. Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. **Cell Biology**, 6: 393-397, 1996.
- MEINECKE, B.; MEINECKE-TILLMAN, S. Effects of alpha-amanitin on nuclear maturation of porcine oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, 98: 195-201, 1993.

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

MOCHLY-ROSEN, D. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction.(Signal Transduction). **Science**, 268: 247-55,1995.

MONGET, P.; FABRE, S.; MULSANT, P.; LECERF, F.; ELSSEN, J.M.; MAZERBOURG, S.; *et al.* Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, 23:139–54, 2002.

MONTREZOR, L.H. Esteroidogênese em ovários bovinos: Estudo in vitro dos efeitos da endotelina-1, angiotensina-II e peptídeo natriurético atrial na dominância e atresia de células da granulosa produtoras de estradiol. 2002. Tese - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

NEÁNT, I.; GERRIER, P. 6-DMP blocks starfish oocyte maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity. **Experimental Cell Research**, 176: 68-79, 1988.

OJEDA, S.R. Female reproductive function. In GRIFFIN, J.E.; OJEDA, S.R.. Text book of Endocrine Physiology, 3<sup>o</sup> Edition, New York: Oxford University Press, 1996: 165-200.

OSBORN, J.C.; MOOR, R.M. The role of steroid signals in the maturation of mammalian oocytes. **J. Steroid Biochemistry**, 19: 133-137, 1983.

PALMA, G.A. Producción *in vitro* de embriones bovinos. In: Palma G.A. Biotecnología de la reproduction. 1<sup>o</sup> Edição. Argentina, 2001, 225-294.

PARK, K.W.; FUNAHASHI, H.; NIWA, K. Co-culture of cumulus-enclosed bovine oocytes with theca cells induces the meiotic arrest but does not inhibit germinal vesicle development. **Journal of Reproduction and Development**, 45: 223-231, 1999.

PAVLOK, A.; LUCANS – HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, 31: 63 – 67, 1992.

PEARSON, G.; ROBINSON, F.; BEERS, G. T.; XU BE; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M.H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocrine Reviews**, 22: 153–83, 2001.

PETERS, A.R. Herd management for reproductive efficiency. **Animal reproduction Science** 42:455-464, 1996.

PICCINATO, C.A. Efeito In Vitro de catecolaminas em células da granulosa de folículos ovarianos bovinos, produtoras de 17 $\beta$ -estradiol. 2002. Dissertação - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - UNESP.

PINCTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 145: 27-37,1998.

PINCUS, G.; ENZMANN, E.V. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. **The Journal of Experimental Medicine**, 62: 655–675, 1935.

POSADA, J.; COOPER, J.A. Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in *Xenopus* oocytes. **Science**, 255: 212-215, 1992.

REED, M.J.; JAMES, V.H.T. Regulation of steroid synthesis and metabolism by growth factors. **Clinical Endocrinology**, 31: 511-525, 1989.

RICHARD, F.J.; SIRARD, M.A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, 54: 22-28, 1996a.

RICHARD, F.J.; SIRARD, M.A. Effects of harvest methods of bovine oocytes co-cultured with follicular hemisections *in vitro* on nuclear maturation. **Theriogenology**, 46: 1243-1250, 1996b.

RICHARDS, J. S. Hormonal control of ovarian follicular development. A 1978 perspective. **Recent Progress in Hormone Research**, 35:343-373, 1979.

RICHTER JD, Dynamics of poly (A) addition and removal during development. In: Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N. Translational control. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996. p. 481-503, *apud* GANDOLFI B.T.A.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, 55: 1255-76, 2001.

ROBERT, E.; GORE-LANGTON; ARMSTRONG, D.T. Follicular steroidogenesis and its control. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. The physiology of reproduction. 2<sup>o</sup> Edição. Nova York: Raven Press, 1994, 11, 571-627.

ROBERTS, A. J.; ECHTERNKAMP, S. E. *In vitro* production of estradiol by bovine granulosa cells: evaluation of culture condition, stage of follicular development, and location of cells within follicles. **Biology of Reproduction**, 51:273-282, 1994.

RODRIGUEZ, K. F.; FARIN, C. E. Developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes after transcriptional inhibition of germinal vesicle breakdown. **Theriogenology**, 61:1499-1511, 2004.

ROSA E SILVA, A. A. M. ; PICCINATO, C. A. ; MONTREZOR, L. H. Polyvinyl alcohol is effective in a defined media long-term bovine granulosa cell culture in the maintenance of 17 beta-estradiol production. In: SSR Society for the Study of Reproduction, 2002, Baltimore, 2002.

SAGATA, N. What does mos do in oocytes and somatic cells? **BioEssays**, 19: 13-21, 1997.

SAGATA, N.; WATANABE, N.; VANDE WOUDE, G.F.; IKAWA, Y. The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. **Nature**, 342: 512-518, 1989.

- SAHMI, M.; NICOLA, E.S.; SILVA, J.M.; PRICE, C.A. Expression of 17- and 3-hydroxysteroid dehydrogenases and steroidogenic acute regulatory protein in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 223: 43–54, 2004.
- SAKAGUCHI, M.; DOMINKO, T.; YAMAUCHI, N.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; NAGAI, T.; FIRST, N. L. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. **Reproduction**, 123: 135–142, 2002.
- SANBUISSHO, A.; THRELFALL, W.R. The influence of serum and gonadotropins on in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. **Theriogenology**, 34: 341-348, 1990.
- SCHMIDT, M.; HYTTEL, P.; AVERY, B.; GREVE, T. Ultrastructure of in vitro matured bovine oocytes after controlled freezing in 10% glycerol. **Animal Reproduction Science**, 37: 281-290, 1995.
- SHIBUYA, E.K.; MASUI, Y. Molecular characteristics of cytosolic factors in amphibian egg cytosols. *Development*, 106: 799-808, 1989.
- SILVA, C.C.; KNIGHT, P.G. Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, 119: 261-269, 2000.
- SIMILI, M.; PELLERANO, P.; PIGULLO, S.; TAVOSANIS, G.; OTTAGIO, L.; SAINT-GEORGES, L.; *et al.* 6-DMAP inhibition of early cell cycle events and induction of mitotic abnormalities. **Mutagenesis**, 12: 313-319, 1997.
- SIMARD, J.; RHEAUME, E.; MEBARKI, F.; SANCHEZ, R.; NEW, M. I.; MOREL, Y.; LABRIE, F. Molecular Basis of Human 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Deficiency. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 53:127-138, 1995.
- SIRARD, M.A.; BILODEAU, S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes in vitro. **Biology of Reproduction**, 43: 777-783, 1990.
- SIRARD, M.A.; BLONDIN, P. Oocyte maturation and IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, 42: 417-426, 1996.
- SIRARD, M.A.; COENEN, K.; BILODEAU, S. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**, 37: 39-55, 1992.
- SIRARD, M.A.; COENEN, K. The co-culture of cumulus-enclosed bovine oocytes and hemisections of follicles: effects on meiotic resumption. **Theriogenology**, 40: 933-942, 1993.
- SIRARD, M.A.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**, 68: 71–76, 2007.
- SIRARD, M.A.; FIRST, N.L. In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. **Biology of Reproduction**, 39: 229-234, 1988.

- SIRARD, M.A.; FLORMAN, H.M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, 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. **Biology of Reproduction**, 40: 1257-1263, 1989.
- SIRARD, M.A.; PARRISH, J.J.; WARE, C.B.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; FIRST, N.L. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. **Biology of Reproduction**, 39: 546-552, 1998.
- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, 65: 126-136, 2006.
- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, 49: 483-497, 1998.
- SIRARD, M.A.; ROY, F.; MERMILLOD, P.; GUILBALT, L.A. The origin of follicular fluid added to the media during bovine IVM influences embryonic development. **Theriogenology**, 44: 85-94, 1995.
- SIROTKIN, A.V.; TARADAJNIK, T.E.; MAKAREVICH, A.V.; BULLA, J. Effect of follicular cells, IGF-I and tyrosine kinase blockers on oocyte maturation. **Animal Reproduction Science**, 51: 333-344, 1998.
- SKINNER, M.K.; OSTEEEN, K.G. Developmental and hormonal regulation of bovine granulosa cell function in the preovulatory follicle. **Endocrinology**, 123:1668-1675, 1988.
- SORENSEN, R. A.; WASSARMAN, P. M. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. **Developmental Biology**, 50: 531-536, 1976.
- STOCCO, M. D. Star protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. **Annual Review of Physiology**, 63:193-213, 2001.
- TATEMOTO, H.; HORIUCHI, T.; TAERADA, T. Effects of cycloheximide on chromatin condensations and germinal vesicle breakdown (GVBD) of cumulus-enclosed and denuded oocytes in cattle. **Theriogenology**, 42: 1141-1148, 1994.
- TATEMOTO, H.; TERADA, T. Time-dependent effects of cycloheximide and  $\alpha$ -amanitin on meiotic resumption and progression in bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, 43:1107-1113, 1995.
- TELFORD, N.A.; WATSON, A.J.; SCHULTZ, G.A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular Reproduction and Development**, 26: 90-100, 1990.
- TSAFRIRI, A.; CHANNING, C.P. Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, 43: 149-152, 1975.
- TSAFRIRI, A.; CHUN, S.Y.; ZHANG, R.; HSUEH, A.J.; CONTI, M. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic

and germ cells: Studies using selective phosphodiesterase inhibitors. **Developmental Biology**, 178:393-402, 1996.

TSAFRIRI, A.; POMERANTZ, S.H. Regulation of the development of meiotic competence and of the resumption of oocyte maturation in the rat. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, 38: 25-43, 1984.

UNGER, V.M.; KUMAR, N.M.; GILULA, N.B.; YEAGER, M. Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. **Science**, 283: 1176-1180, 1999.

VAN BLERKOM, J. Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 88: 5031-5035, 1991.

VAN BLERKOM, J.; BELL, H.; WEIPZ, D. Cellular and developmental biological aspects of bovine meiotic maturation, fertilization and preimplantation embryogenesis in vitro. **Journal of Electron Microscopy Technique**, 16: 298-323, 1990.

VANDERHYDEN, B.C.; MACDONALD, E.A. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis throughout follicular development. **Biology of Reproduction**, 59: 1296-1301, 1998.

VASQUEZ, D. Inhibitors of protein synthesis. **FEBS Lett**, 40: S63-S64, 1974 *apud* SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, 49: 483-497, 1998.

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

VERLHAC, M.H.; PENNART, H.D.; MARO, B.; COBB, M.H.; CLARKE, H.J. MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. **Development**. 158: 330-340, 1993.

VIGNERON, C.; PERREAU, C.; DALBIÉS-TRAN; JOLY, C.; HUMBLLOT, P.; UZBEKOVA, S.; MERMILLOD, P. Protein synthesis and mRNA storage in cattle oocytes maintained under meiotic block by roscovitine inhibition of MPF activity. **Molecular Reproduction and Development**, 69: 457-465, 2004.

VIREQUE, A. A. ; SA, V. F. ; J.H.M, V. ; L.S., C. ; M.V.B.SILVA, ; ROSA E SILVA, A. A. M. . Estradiol 17 Produces Granulosa Cells Inhibit Meiosis Resumption of Bovine Oocytes Under Chemically Defined Conditions. In: SBFis/ALACF, 2003, Ribeirão Preto. Resumos ALACF, 2003. p. 364.

XU, Z.Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNGQUIST, R.S. Expression of FSH and LH receptor mRNA in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, 53:951-958, 1995.

WASSERMAN, P.M. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. The Physiology of reproduction. 2ª Edição. Nova York:Raven Press, 1994. 3, 79-122.



WATANABE, N.; VANDE WOUDE, G.F.; IKAWA, Y.; SAGATA, N. Specific proteolysis of the c-mos oncogene by calpain on fertilization of *Xenopus* eggs. **Nature**, 342: 505-511, 1989.

WEBB, R.; MC BRIDGE, D. Control of the proliferation of granulosa cells from small ovine follicles. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, 43: 229-230, 1990.

WEHREND, A.; MEINECKE, B. Kinetics of progression, M-phase promoting factor (MPF) 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. **Animal Reproduction Science**, 66: 175-184, 2001.

WILLIAMS, R.H., LARSEN, P.R. Textbook of Endocrinology, 10<sup>o</sup> Edition. Philadelphia: Saunders Company; 2003:592-610.

WRENZYCKI, C., D. HERRMANN, A. LUCAS-HAHN, E. LEMME, K. KORSawe, AND H. NIEMANN. Gene expression patterns in in vitro-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? **Animal Reproduction Science**, 82-83:593-603, 2004.

WU, B.; IGNOTZ, G.G.; CURRIE, B.; YANG, X. Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and cumulus cells during maturation in vitro of bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, 45: 560-565, 1996.

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. **Molecular Reproduction and Development**, 40: 338-344, 1995.