

UFSM

Tese de Doutorado

**EXPRESSÃO DE ANEXINA II EM
OÓCITOS E NO DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO BOVINO**

Luís Fabiano Santos da Costa

PPGMV

Santa Maria, RS, Brasil

2004

**EXPRESSÃO DE ANEXINA II EM
OÓCITOS E NO DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO BOVINO**

por

Luís Fabiano Santos da Costa

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração de Fisiopatologia da Reprodução, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de

Doutor em Medicina Veterinária

PPGMV

Santa Maria, RS, Brasil

2004

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Tese de Doutorado

**EXPRESSÃO DE ANEXINA II EM
OÓCITOS E NO DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO BOVINO**

Elaborada por

Luís Fabiano Santos da Costa

Como requisito parcial para obtenção do grau de

Doutor em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA

Paulo Bayard Dias Gonçalves
(Presidente/Orientador)

João Francisco Coelho de Oliveira

Elgion Loretto

Carlos Fernando de Mello

Kátia Padilha Barreto

Santa Maria, 31 de agosto de 2004

AGRADECIMENTOS

Ao professor Paulo Bayard Dias Gonçalves pela orientação, ensinamentos e dedicação, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Ao professor João Francisco Coelho de Oliveira pela sua disponibilidade para esclarecimentos, amizade e companheirismo.

Aos membros do BioRep, alunos de graduação e de pós-graduação pela colaboração constante, convívio, amizade e principalmente pelas horas agradáveis que passei no BioRep, sentirei falta.

A Márcia, minha principal incentivadora, que desde a minha entrada no laboratório, foi companheira, esposa, colega, enfrentando junto todos os percalços pelos quais passei, tenho certeza que não teria chegado até aqui sem esse apoio.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Eroni, que sempre me incentivaram, mostrando o caminho da verdade, do amor, da união familiar, mãe, os puxões de orelha valeram a pena, pai, exemplo de tranquilidade e serenidade para resolver os problemas, obrigado.

Ao meu pequeno tesouro, Maria Luiza, que me fez enxergar a vida de uma outra forma.

Também as minhas sobrinhas recém chegadas, Nicole e Karine, as quais ainda não pude conhecer.

A minha irmã Joseane que esteve sempre presente nas minhas decisões e ao Arlan, amigo, cunhado e principalmente colorado.

A Giselle, que embora não sendo sobrinha de sangue, adotei como se fosse.

A minha sogra Consuelo e a cunhada Denise, que sempre nos apoiaram nessa jornada.

A todos os meus amigos, que de uma forma ou de outra estiveram ao meu lado, Silvia, Rafael, Bortolotto, Marcelo, Alexandre, Serginho, Willian, Fernando, Marlon, Jerônimo, Patricia, Isabele, incentivando e tornando esta jornada mais suave.

Ao CAPES e a FAPERGS pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
SUMÁRIO	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
Oogênese	4
Maturação Citoplasmática.....	7
Foliculogênese.....	8
Produção de embriões <i>in vitro</i>	11
Anexina II.....	12
Estrutura tridimensional da anexina II.....	16
Fatores de Crescimento	17
Retinol	19
CAPÍTULO 2- ANNEXIN II EXPRESSION IN BOVINE OOCYTES DURING FOLLICULAR DEVELOPMENT.....	23
Abstract	24
Introduction.....	25
Materials and Methods.....	27
Results and Discussion	30
References	33

CAPÍTULO 3 - PROFILE AND REGULATION OF ANNEXIN II EXPRESSION DURING EARLY EMBRYOGENESIS IN CATTLE	39
Abstract	40
Introduction	41
Materials and Methods	44
Results	48
Discussion	49
References	52
DISCUSSÃO.....	59
CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Estrutura do tetrâmero formado pela anexina II e p11. Os retângulos maiores representam as seqüências de repetições com 70 a.a., sendo que cada uma possui uma região altamente conservada de 17 a.a., representado pelas porções pretas. A anexina II possui os sítios de ligação para a proteína S-100 (P11), e os sítios de fosforilação S e Y para serina/treonina e tirosina respectivamente (Gerke & Moss, 1997).16

CAPÍTULO 2

Figure 1: Semiquantitative analysis of the Ann-II gene expression in oocytes from different follicle size (<3mm, 5-8mm, >8mm), at germinal vesicle (G) and metaphase II (MII) stages. Data are shown as mean and standard error of the mean. Different letters in the same stage indicate statistical difference ($p < 0.05$).37

Figure 2: Semiquantitative Ann-II expression in oocytes matured for 24h, without (control sample) and supplemented with 1ng retinol/mL (treatment group) in culture medium. The data are shown as mean and standard error of the mean. Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$).38

CAPÍTULO 3

Figure 1. Representative gel showing the expression of the Ann-II gene in embryos at different stages of development. C: control; 2cel, 4cel, 8cel, 16cel and 32cel: 2, 4, 8, 16 and 32 cells, respectively; MO: morula; BL: blastocyst; BX: expanded blastocyst.56

Figura 2. Percentual de embriões obtidos sobre o número total de oócitos cultivados. Os embriões foram cultivados em meio SOF (controle) ou suplementados com 10ng/ml de meio de IGF-I ou 0,1ng/ml de meio de retinol. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).57

Figura 3. Expressão semiquantitativa de ANEII em embriões bovinos. Os embriões foram cultivados em meio SOF (controle) ou suplementados com 10ng/ml de meio de IGF-I ou 0,1ng/ml de meio de retinol. Os dados são apresentados na relação de ANEII/GAPDH. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).58

LISTA DE ABREVIATURAS

a.a.- aminoácidos
AI- anáfase I
ANEII- anexina II
EGF- fator de crescimento epidermal
FC- fatores de crescimento
PIV- produção *in vitro* de embriões
IGF-I- fator de crescimento semelhante à insulina
IGF-IR- receptor para IGF-I
LDL- lipoproteína de baixa densidade
MI- metáfase I
MPF- fator intracelular promotor da fase-M
MII- metáfase II
ROL- retinol
PK-A- proteína quinase-A
p11- Calpactina I *light chain*
RAR- receptor para ácido retinóico
RBP- proteína carreadora de retinol
RE- retinil éster
RI- receptores para insulina
RVG- rompimento da vesícula germinativa
Ser-25- serina/treonina
SFB- soro fetal bovino
SVE- soro de vaca em estro
S-100A10- proteína p11
TI- telófase I
Tir-23- tirosina
VG- vesícula germinativa
vit A- vitamina A

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

EXPRESSÃO DE ANEXINA II EM OÓCITOS E NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO BOVINO

AUTOR: LUÍS FABIANO SANTOS DA COSTA

ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 31 de Agosto de 2004.

O objetivo do presente estudo foi determinar o perfil de expressão de anexina II (ANEII) em folículos pré-antrais, oócitos e desenvolvimento embrionário bovino, e sua regulação pelo retinol e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I). Expressão de ANEII foi verificada em folículos primordial, primário e secundário, em oócitos de folículos antrais de diferentes tamanhos (<3mm, 5-8mm e >8mm de diâmetro), em embriões de 2, 4, 8, 16 e 32 células e em blastocisto e blastocisto expandido. Além disso, foi investigada a influência do retinol sobre a expressão de ANEII em oócitos e no desenvolvimento embrionário e, neste último, também foi estudada a participação do IGF-I na expressão dessa proteína. Ovários de fêmeas bovinas adultas e de fetos foram coletados em abatedouro e submetidos a punção folicular ou isolamento de folículos pré-antrais. Complexos cumulus-oócito e folículos pré-antrais foram processados para extração de RNAm, obtenção de cDNA e realizado reação da polimerase em cadeia (PCR) com oligonucleotídeos específicos para ANEII. Foram utilizados embriões bovinos produzidos *in vitro* em diferentes estádios de desenvolvimento em meio SOF e também suplementados com retinol e IGF-I. Os embriões foram processados para extração de RNAm, obtenção de cDNA e realizada a reação da polimerase em cadeia (PCR) com oligonucleotídeos específicos para ANEII. Apenas folículos pré-antrais secundários apresentaram expressão de ANEII. Em estágio de vesícula germinativa (VG), os oócitos oriundos de diferentes tamanhos foliculares diferiram entre si ($p<0,05$) quanto à expressão de ANEII, onde oócitos de folículos <3mm e de 5-8mm foram significativamente inferiores aos oócitos de folículos >8mm. Em metáfase II (MII), oócitos de folículos <3mm apresentaram menor expressão de ANEII em relação à oócitos de folículos >8mm ($p<0,05$) e não diferiram de oócitos de folículos de 5-8mm. No entanto, oócitos de folículos de 5-8mm foram similar na expressão de ANEII aos oócitos de folículos >8mm. O retinol utilizado no período de maturação promoveu um incremento na expressão de ANEII quando comparado ao controle ($p<0,05$). A ANEII está presente em todos os estádios de desenvolvimento embrionário precoce, com exceção em embriões de 16 células. A utilização de retinol durante o desenvolvimento

embrionário, promoveu um incremento significativo ($p < 0,05$) na produção de blastocisto, avaliados no dia 6 após a fecundação, em relação ao grupo controle e ao grupo IGF-I. No grupo controle foi obtido um percentual de 20,5% (24/117) de blastocistos sobre o número total de oócitos cultivados, não diferindo do grupo IGF-I, onde se obteve um índice de 25,8% (24/93) de blastocistos. No grupo retinol, o percentual de blastocisto foi significativamente superior com 37,8% (45/119). Na avaliação semiquantitativa da expressão de ANEII em embriões produzidos em meio suplementado com IGF-I (10ng/ml de meio) ou retinol (0,1ng/ml de meio), foi observado uma menor expressão de ANEII quando estas substâncias estavam presentes no meio em relação ao controle ($p < 0,05$). A expressão semiquantitativa de ANEII não diferiu entre os grupos retinol e IGF-I. A ANEII tem uma maior expressão em oócitos capacitados e o retinol aumenta a disponibilidade de RNAm para ANEII, podendo estar envolvido na regulação da competência oocitária por diminuir a tradução ou evitar a degradação. A produção de embriões *in vitro* é incrementada na presença de retinol que atua modulando a expressão de ANEII durante o desenvolvimento embrionário. A diminuição na expressão de ANEII na embriogênese de bovinos determina um aumento qualitativo e quantitativo na produção *in vitro* de embriões.

ABSTRACT

Thesis

Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

EXPRESSÃO DE ANEXINA II EM OÓCITOS E NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO BOVINO

AUTHOR: LUÍS FABIANO SANTOS DA COSTA

ADVISER: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Date and Local of the Defense: Santa Maria, August 31th, 2004.

(ANNEXIN II GENE EXPRESSION IN BOVINE
OOCYTES AND EMBRYONIC DEVELOPMENT)

The present study was conducted to examine semiquantitative gene expression of annexin II (ANEII) during all follicular phases of folliculogenesis in bovine, in preantral follicles and oocytes of antral follicles too in different size (<3mm, 5-8mm e >9mm in diameter). It was investigated the gene expression of ANEII influenced by retinol during oocyte maturation. In addition we examine annexin II (ANEII) presence during embryonic development and regulation of gene expression to ANEII by retinol and insulin like growth factor (IGF-I) was available. Bovine ovaries from adults and fetal females were collected in abattoir and cumulus-oocyte complexes and preantral follicles were recovered. mRNA extraction and cDNA formation was carried out to produce ANEII amplification by polymerase chain reaction. Bovine embryos were used at initial phases of development from in vitro production in SOF medium or retinol and/or IGF-I supplemented. Bovine embryos were submitted to mRNA extraction and cDNA formation and ANEII amplification was obtained by polymerase chain reaction (PCR). Preantral follicles at secondary stages presented gene expression to ANEII. Oocytes from different follicular sources in germinal vesicle (GV) stage were significantly different ($p<0,05$) in gene expression. Gene expression to ANEII in oocytes of larger 8mm follicles were significantly higher than those from 3mm and 5-8mm ($p<0,05$). The similar results were obtained in metaphase II (MII) phase. However difference was not observed between oocytes from 3mm and 5-8mm follicles. Oocytes from follicles larger 8mm presented higher ANEII expression than those from 3mm follicles, but difference was not observed to the oocytes from 5-8mm ($p<0,05$). The ANEII gene expression was increase with retinol supplementation during maturation process in contrast to control group ($p<0,05$). The ANEII was present during early embryonic development except in 16 cells. The rate of embryo production was increased by supplementation with retinol in culture medium ($p<0,05$) in contrast with control and IGF-I group. The control group (20,5%; 24/117) was similar with

IGF-I group (25,8%; 24/93) and both were significantly lower than retinol (37,8%; 45/119). Semi quantitative analyses of ANEII gene expression was significantly higher in control group than retinol or IGF-I embryo treated ($p < 0,05$). However retinol and IGF-I were not different. ANEII have more expression in oocytes in capacitating process. Retinol increases the mRNA availability to ANEII and could be involved in oocyte competence. In conclusion, in vitro embryo production is increased by retinol supplementation and could be regulating the gene expression of ANEII during embryo development. Decrease in gene expression to ANEII determines a qualitative and quantitative increase in in vitro embryo production.

INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) bovinos, representa uma das principais ferramentas de multiplicação de material genético. Por muitos anos, as pesquisas voltaram-se para a sua aplicabilidade a campo, de modo que o produtor pudesse dispor dessa ferramenta em seus rebanhos. No entanto, os índices de produção de embriões *in vitro* ainda estão muito baixos, além de se observar uma grande variabilidade de resultados, quando se utilizam animais de grupos heterogêneos. Além disso, os resultados de prenhez ainda estão abaixo dos índices obtidos com o sistema tradicional de transferência de embriões. Os índices de prenhez com embriões grau 1 produzidos *in vitro* e transferidos a fresco (59%) ou congelados (42%) são inferiores aos produzidos *in vivo* (frescos, 76% ou congelados, 67%; Hasler, 1996).

Em bovinos, ao quarto ciclo de divisão celular, há a ativação do genoma embrionário e, nessa fase, é que um grande número de embriões, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, cessam o seu desenvolvimento. É possível que determinados genes relacionados à divisão celular estejam envolvidos nesse bloqueio.

A partir dos avanços em biologia molecular, muitos questionamentos a respeito dos mecanismos envolvidos durante todas as fases da produção *in vitro* de embriões já foram elucidadas e outros tantos foram gerados, especialmente sobre a expressão e função de determinados genes envolvidos no processo de divisão celular e diferenciação.

A regulação da progressão do ciclo celular é um processo complexo envolvendo cascatas de quinases, ação de proteases, ação de segundo mensageiro e outros fatores. Há evidências de que a concentração de cálcio intracelular tem um papel crucial nestes eventos. Níveis circulantes de cálcio ocorrem durante todas as fases do ciclo celular e são observados junto com o reinício da meiose. Um grande número de proteínas tem sido apontado como mediadoras do efeito do Ca^{2+} no ciclo celular, as proteínas S-100 regulam a atividade da p53, um supressor de tumor, que modula a expressão de genes fundamentais para a progressão do ciclo celular. Outra proteína ligadora de Ca^{2+} é a Anexina II que é responsável juntamente com a Mbh1 pela ligação de seqüências de DNA aos replissomas, sendo considerada como importante durante o processo de replicação de DNA.

A Anexina II pode ser uma forte candidata a ter função na meiose e divisão celular inicial em embriões. No entanto, até o presente momento não há informações sobre a expressão de Anexina II em folículos pré-antrais, em oócitos bovinos e durante o período de desenvolvimento embrionário precoce em bovinos. É possível que oócitos de folículos de diferentes tamanhos possam apresentar um perfil individual de expressão de Anexina II. Esses perfis de expressão podem sofrer influência de fatores de crescimento como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) que possui como característica, quando presente no meio de desenvolvimento embrionário, incrementar o número de células de embriões além de melhorar a qualidade desses. Além dos fatores de crescimento, o

retinol (ROL) um álcool-lipídico, com efeito biológico característico de vitamina A, também apresenta efeito benéfico quando suplementado no meio de cultivo, promovendo um incremento nas taxas de obtenção de blastocisto.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de determinar o perfil de expressão de anexina II (ANEII) em folículos pré-antrais, oócitos e desenvolvimento embrionário bovino, e sua regulação pelo retinol e IGF-I. Foram investigados os perfis de expressão de anexina II (ANEII) durante as fases da foliculogênese em bovinos, em folículos pré-antrais; o perfil de expressão de ANEII em oócitos de folículos antrais de diferentes tamanhos (<3mm, 5-8mm e >8mm de diâmetro); o perfil de expressão de ANEII em embriões de 2, 4, 8, 16 e 32 células e em blastocisto e blastocisto expandido; a influência do retinol sobre a expressão de ANEII em oócitos durante a maturação, e o efeito do IGF-I e do retinol sobre a expressão de ANEII no desenvolvimento embrionário.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Oogênese

A formação dos gametas femininos em bovinos ocorre durante o período embrionário, próximo aos 40 dias de gestação (Russe, 1983). O processo de formação, desenvolvimento e maturação do oócito é denominado de oogênese. As oogônias sofrem constantes divisões mitóticas, sendo tão intensas que o número dessas células aos 110 dias de gestação, pode chegar próximo a 2.700.000 (Erickson, 1966). Após as divisões mitóticas, inicia-se o processo de divisão meiótica. Em camundongos e humanos, foi demonstrado que esse processo se estende por toda a vida reprodutiva (Johnson et al, 2004). Em bovinos, a meiose de células gonadais inicia em torno do 82º dia de gestação. Durante o período de transição entre as duas fases de divisão, as células germinativas estão na fase de pré-leptóteno, a qual é caracterizada pelo aumento no tamanho dessas células.

Esse aumento de tamanho, associado à síntese final de DNA, caracteriza a passagem de oogônia para oócito primário (Erickson, 1966; Betteridge et al., 1989). Seguindo a divisão meiótica, o oócito passa de pré-leptóteno para leptóteno, zigóteno, paquíteno e permanece no estágio de diplóteno, onde sofre um bloqueio na progressão da divisão. Esta fase de bloqueio também é denominada de dictióteno ou vesícula germinativa (VG) e permanece nela até que haja um estímulo para o reinício da meiose. Os oócitos podem

permanecer bloqueados durante muito tempo até que recebam um estímulo. Esse sinal, *in vivo*, ocorre concomitante com o pico pré-ovulatório de LH (Sirard & First, 1988).

Para que o oócito reinicie a meiose, é necessário atingir a sua competência. Esta competência é adquirida a partir do aparecimento do antro folicular, em oócitos medindo aproximadamente 92 μ m (Braw-Tal & Yossefi, 1997). Antes dessa fase os oócitos são denominados de incompetentes por serem deficientes em RNAs mensageiros que codificam para o fator intracelular promotor da fase-M (MPF). O MPF é uma serina/treonina proteína quinase composta por uma sub-unidade catalítica (p34^{cdc2}) e uma sub-unidade regulatória (ciclina-B; Lohka et al., 1988). Enzimas quinases e fosfatases estão envolvidas no reinício e na completa maturação meiótica do oócito. Oócitos em fase de crescimento apresentam níveis muito baixos de p34^{cdc2} e não são capazes de progredirem da fase G2 (intervalo entre a síntese de DNA e divisão celular) para a fase M (divisão celular, meiose). O MPF ativo induz a condensação dos cromossomos, determina a quebra da vesícula germinativa e reorganiza o citoplasma tanto na divisão mitótica como na meiótica (Parrish et al., 1992). No final da fase de crescimento, a concentração e a atividade de p34^{cdc2} está aumentada e o oócito passa a ter competência meiótica (Wu et al., 1997).

O oócito atinge seu crescimento total (~150 μ m) e, conseqüentemente, sua competência máxima em folículos com diâmetro entre 1,7 e 2,0mm (Braw-Tal & Yossefi, 1997). O reinício da divisão *in vivo* ocorre concomitantemente com o pico pré-

ovulatório de LH (Edwards, 1965; Tsafiri & Kraicer, 1972; Dekel et al., 1988; Hyttel et al., 1989; Sun & Moor, 1991). Esse processo pode acontecer espontaneamente, *in vitro*, pela simples retirada do oócito do interior do folículo, uma vez que ocorre o desligamento das unidades funcionais (os canais intercomunicantes) entre o folículo e o oócito, que promovem interações parácrinas com elementos da matriz extra-celular (Edwards, 1965; Donahue, 1968; Thibault, 1977; Sirard & Coenen, 1993; Eppig, 1992). Entende-se por maturação nuclear as mudanças que ocorrem no oócito totalmente crescido, incluindo a progressão do estágio de diplóteno da primeira prófase meiótica à metáfase II e, conseqüentemente, o término da primeira redução meiótica. A seqüência de modificações que ocorre durante a maturação nuclear, na espécie bovina, requer de 18 a 20 horas de incubação do oócito *in vitro* (Sirard et al., 1989).

Os oócitos, durante a maturação, apresentam modificações morfológicas nos seus cromossomos, essas mudanças servirão como suporte para identificação do estágio específico da maturação nuclear. A vesícula germinativa (VG) é um dos estádios da maturação nuclear que se caracteriza por possuir um núcleo de tamanho grande, ocupar um terço do ooplasma e possuir a cromatina em forma de filamentos finos, nucléolo grande e membrana nuclear visível. O rompimento da vesícula germinativa (RVG) é a fase onde ocorre a condensação da cromatina e a dissociação da membrana nuclear. Na metáfase I (MI), os cromossomos encontram-se em um mesmo plano equatorial, a membrana nuclear está dissociada e os cromossomos homólogos estão inicialmente aderidos no quiasma. O processo de maturação continua

onde os cromossomos homólogos se separam, formando dois pares de cromossomos em cada borda do oócito, o quiasma se separa e os cromossomos homólogos movem-se para pólos opostos, sendo denominado de anáfase I (AI). A telófase I (TI) é marcada pelo início da divisão assimétrica do citoplasma, onde os microtúbulos desaparecem e o envelope nuclear começa a reaparecer. Na citocinese I, a divisão forma oócito secundário e o primeiro corpúsculo polar. A interfase II é uma fase curta, onde não há síntese de DNA. Na prófase II ocorre uma parada no ciclo celular, passando a metáfase II (MII), onde ocorre uma separação total da porção do citoplasma, dando origem ao primeiro corpúsculo polar. O oócito fica com a metade do número de cromossomos, com duplo complemento de DNA ($2n$ DNA), denominando-se de oócito secundário. O estágio de metáfase II é o segundo período de repouso da divisão meiótica. O mesmo processo ocorre para a segunda divisão meiótica, a qual só será iniciada se o oócito for fecundado ou ativado partenogeneticamente (Russe, 1983; Eppig, 1992; Milovanov & Sirard, 1994).

Maturação Citoplasmática

Durante o processo de crescimento e maturação, os oócitos sofrem algumas alterações no tamanho e relação das organelas citoplasmáticas, bem como o desenvolvimento das estruturas específicas na zona pelúcida e grânulos corticais (Fair et al., 1997). O aparelho de golgi aumenta sua atividade, secreta glicoproteínas para

formação da zona pelúcida e substâncias que estão envolvidas na formação dos grânulos corticais, havendo aumento em número e tamanho dessas organelas.

Nesse período, também há a multiplicação mitocondrial, mudando sua forma nos oócitos imaturos de alongada, para oval nos oócitos maduros (Wassarman & Albertini, 1994). As organelas após sofrerem mudanças em seu tamanho e forma, no ooplasma, mudam sua distribuição, aproximam-se do centro conforme ocorre a maturação. Essas mudanças evidenciam que a manutenção dos oócitos em bloqueio da meiose é fundamental para o acúmulo de moléculas, principalmente a partir de expressão gênica, que serão utilizadas durante a fecundação e desenvolvimento embrionário (Mermillod et al., 1996).

Foliculogênese

Os folículos são classificados basicamente em duas categorias, antes e após a formação do antro. Folículos pré-antrais são aqueles que compreendem desde a fase folicular inicial, folículo primordial, passando por folículo primário, até o estágio de folículo secundário (Hulshof et al., 1994). Os folículos antrais ou terciários são aqueles que apresentam uma cavidade denominada de antro. Os folículos primordiais são compostos de um oócito, uma membrana basal e uma única camada de células da pré-granulosa, podendo estas serem cubóides ou achatadas (van Wezel & Rodgers, 1996), ao contrário do

que se pensava de que folículos primordiais apresentavam exclusivamente células achatadas da granulosa. Os folículos primordiais têm um diâmetro inferior a $40\mu\text{m}$, com um oócito medindo em torno de $29\mu\text{m}$, não apresentando vestígios de zona pelúcida. A ativação da passagem de folículo primordial para primário ocorre quando os folículos têm aproximadamente 10 células cubóides da granulosa (Braw-Tal & Yossefi, 1997) e é caracterizada pelo aumento no tamanho do oócito, proliferação das células da granulosa e início da formação da zona pelúcida (van Wezel & Rodgers, 1996). O estímulo para que inicie o crescimento folicular ainda permanece de origem desconhecida. Em bovinos, van Wezel & Rodgers (1996) e Braw-Tal & Yossefi (1997) afirmam que o início do crescimento de folículos pré-antrais independe da presença de gonadotrofinas. No entanto, a adição de FSH ao meio de cultivo proporciona uma proliferação das células da granulosa (Wang & Greenwald, 1993) e folículos primordiais e primários se mantêm em meio sem FSH, porém, não chegam ao estágio de folículo secundário (Cain et al., 1995).

Acima de $60\mu\text{m}$ de diâmetro, os folículos são considerados secundários e caracterizam-se por uma grande quantidade de células da granulosa, distribuídas em várias camadas, com uma zona pelúcida já completamente formada e um oócito que varia de 50 a $70\mu\text{m}$ de diâmetro (Buccione Et Al., 1990; Braw-Tal & Yossefi, 1997). O folículo terciário é caracterizado pelo aparecimento do antro folicular, isto se dá em bovinos, com folículos medindo ao redor de 100 - $300\mu\text{m}$ de diâmetro (van Wezel & Rodgers, 1996; Braw-Tal & Yossefi,

1997), possuindo um oócito com aproximadamente 92 μ m, uma zona pelúcida e mais de seis camadas de células da granulosa. Com o aumento das camadas da granulosa, ocorre uma invasão de capilares sangüíneos, formando desta maneira a teca interna, uma camada vascular do folículo, que por sua vez, encontra-se rodeada por uma camada externa de fibroblasto, a teca externa. O antro folicular é formado pelo acúmulo de líquido entre as células. O líquido folicular é um transudato de origem plasmático (Greenwald & Roy, 1994). No período de transição entre folículo secundário e terciário, ocorre o crescimento final do oócito, com síntese de proteínas e aquisição da competência para o rompimento da vesícula germinativa (Eppig & Schroeder, 1989), que determina o reinício da meiose.

A expansão do antro folicular é contínua até que o folículo chegue ao estágio pré-ovulatório, com um diâmetro em torno de 2,0-2,5cm, possuindo um oócito maturado, aderido à parede do folículo através de um grupo de células denominado de cumulus oophorus, que são células da granulosa diferenciadas. Estes são os eventos fisiológicos da foliculogênese, porém, apenas 0,1% dos folículos chegam à ovulação (Ireland, 1987), o restante sofre degeneração e atresia folicular desde o nascimento e ao longo da vida do animal, caracterizando uma perda de material genético (Erickson, 1966).

Produção de embriões *in vitro*

A PIV em bovinos, representa uma das principais ferramentas de multiplicação de material genético. Por muitos anos, as pesquisas voltaram-se para a sua aplicabilidade a campo, de modo que o produtor pudesse dispor dessa ferramenta em seus rebanhos. No entanto, os índices de produção de embriões *in vitro* ainda estão muito baixos, além de se observar uma grande variabilidade de resultados quando se utilizam animais de grupos heterogêneos. Além disso, os resultados de prenhez ainda estão abaixo dos índices obtidos com o sistema tradicional de transferência de embriões. Os índices de prenhez com embriões grau I produzidos *in vitro* e transferidos a fresco (59%) ou congelados (42%) são inferiores aos produzidos *in vivo* (frescos, 76% ou congelados, 67%; Hasler, 1996).

Em bovinos, ao quarto ciclo de divisão celular, há a ativação do genoma embrionário e, nessa fase, é que um grande número de embriões, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, cessa o seu desenvolvimento. É possível que determinados genes relacionados à divisão celular estejam envolvidos nesse bloqueio. A partir dos avanços nos estudos de biologia molecular, muitos questionamentos a respeito dos mecanismos envolvidos durante todas as fases da produção *in vitro* de embriões já foram elucidados e outros tantos foram gerados, especialmente sobre a expressão e função de determinados genes envolvidos no processo de divisão celular e diferenciação. A regulação da progressão do ciclo celular é um processo complexo envolvendo cascatas de quinases, ação de proteases, ação de segundo

mensageiro e outros fatores. Há evidências de que a concentração de cálcio intracelular tem um papel crucial nestes eventos. Níveis circulantes de cálcio ocorrem durante todas as fases do ciclo celular e são observados junto ao reinício da meiose. Um grande número de proteínas tem sido apontado como mediadoras do efeito do Ca_2^+ no ciclo celular, as proteínas S-100 regulam a atividade da p53, um supressor de tumor, que modula a expressão de genes fundamentais para a progressão do ciclo celular. Outra proteína ligadora de Ca_2^+ é a anexina II que é responsável juntamente com a Mbh1 pela ligação de seqüências de DNA aos replissomas, sendo considerada como importante durante o processo de replicação de DNA.

A anexina II é uma forte candidata a ter função na meiose e divisão celular inicial em embriões. No entanto, até o presente momento não há informações sobre a expressão de anexina II em folículos pré-antrais, em oócitos bovinos e durante o período de desenvolvimento embrionário precoce em bovinos. É possível que oócitos de folículos de diferentes tamanhos possam apresentar um perfil individual de expressão de anexina II.

Anexina II

A anexina pertence a uma família de multigenes com mais de 20 membros distintos com baixo peso molecular (9-11 KDa; Morgan & Fernandez, 1997). A anexina tem sido observada em diversos organismos como nematóides, plantas e vertebrados. Estas

observações sugerem que a anexina possa ter funções em uma série de eventos fisiológicos em organismos multicelulares. Existem vários sinônimos para a anexina II como p34, p36, p39, *calpactin I heavy chain*, *protein I*, *chromobindina 8*, *lipocortina II* e *placental anticoagulant protein IV* (Raynal & Pollard 1994).

Apesar da anexina ter sido inicialmente caracterizada como uma proteína celular, também é transportada para o meio extracelular onde é encontrada na forma solúvel assim como proteína de membrana (Chung & Erickson, 1994). Essa proteína é encontrada em tecidos como um monômero de 36 kDa e um heterotetrâmero com 96 kDa. A ANEII está associada na forma de um tetrâmero (p112AII2) a outra proteína, Calpactina I *light chain* (p11), pertencente à família de proteínas S-100 (Rothhut, 1997). Assim como todas as anexinas, a ANEII possui um domínio nuclear de quatro segmentos repetidos, sendo cada um de aproximadamente 70 aminoácidos (a.a.). A porção N terminal da ANEII possui um sítio de fosforilação serina/treonina (Ser-25) para a PK-C (Jost & Gerke, 1996) e um sítio de fosforilação tirosina (Tir-23) para pp60-Src, verificados *in vitro* e *in vivo* (Rothhut, 1997).

Bioquimicamente, as anexinas são conhecidas pela sua habilidade de ligar-se ao cálcio e a fosfolipídios. Estas propriedades representam o mecanismo base para o entendimento do papel delas no transporte de membrana. A anexina II é uma proteína ligadora de fosfolipídio dependente de cálcio e é expressa amplamente em tecidos epiteliais, intestino, pulmão, células superficiais do endotélio vascular e em tecidos do trato reprodutivo de humanos como o endométrio, o ovário,

o epitélio germinativo, a túnica albugínea e o estroma ovariano (Dreier et al, 1998). A ANEII participa na regulação de uma variedade de processos como exocitose na presença de cálcio, também atua na ativação do plasminogênio (Brownstein et al., 2004), na adesão celular e na regulação da exocitose e endocitose pela organização da F-actina (Fitzpatrick, 2000).

Outras funções da ANEII incluem transporte de imunoglobulinas (Kristoffersen & Matre, 1996) e atividade de canais de íons (Burger et al., 1996). A ANEII participa também de forma significativa na invasão tumoral e na formação de metástases. Na superfície das células metastáticas de linfomas, a ANEII aumenta a adesão dessas células às células endoteliais dos sinusóides pulmonares (Tressler et al., 1993). Recentemente, foi descrito que os receptores para insulina (RI) e receptor para IGF-I (IGF-IR) podem fosforilar a ANEII na porção N terminal onde possui o sítio de fosforilação Tyr-23. Também ficou demonstrado que a estimulação com insulina incrementa a quantidade de anexina II extracelular (Zhao et al., 2003). Além dessas funções, a anexina II está relacionada a receptores de vitamina D₃, onde foi observado a sua atuação como um receptor de sinalização rápida, ou seja, não havendo necessidade de um efeito gênico sobre a utilização da forma ativa da vitamina D₃ (Schwartz, 2002).

As anexinas de uma maneira geral possuem uma distribuição variada nos diferentes tipos celulares. A regulação gênica por sua vez está relacionada ao tipo celular e a função da célula. Izant & Brysons (1991) demonstraram a presença de RNAm de anexina II em todas as fases da oogênese e do desenvolvimento embrionário em *Xenopus*.

Em peixes, as regulações da maturação do oócito e da ovulação têm sido bastante estudadas, especialmente com relação à indução de desova artificial. Porém os eventos que procedem esta fase recebem menor atenção, especialmente com relação a que genes estão envolvidos ou quais proteínas podem estar envolvidas nesse período. Bobe & Goetz (2000) isolaram uma seqüência de a.a., a partir de tecido ovariano, similar à seqüência de a.a. de dois membros da família S-100 (S-100A1 e S-100A10). A expressão dessa proteína manteve-se alta 24 horas antes do rompimento da vesícula germinativa, durante o RGV e 24 horas após. Também foi observado que 48 horas e 6-8 dias após a ovulação, houve uma diminuição significativa na expressão dessa proteína, sugerindo um importante papel no período periovulatório.

Em nosso laboratório, foi detectada, através de imunohistoquímica, a presença da proteína S-100 em oócitos de folículos pré-antrais e antrais de fetos bovinos (Costa, 1999). Porém, não ficou determinado que sub-tipo da proteína S-100 estava presente. Isso gerou a hipótese de que a anexina II, associada à proteína p11 (S-100A10), pudesse estar presente em todas as fases da produção *in vitro* de embriões, sendo um gene candidato a participar desses eventos. No entanto, a sua função específica na maturação de oócito ainda não foi determinada e, em bovinos, a expressão e função dessa proteína na oogênese e desenvolvimento embrionário não foram estudadas. Também, a influência de determinados fatores de crescimento, que possuem a habilidade de ativar a transcrição/tradução de proteínas nucleares, como o IGF-I, possa estar

envolvido na regulação da anexina II. O retinol é outra substância com capacidade de regular a síntese protéica, promover a proliferação e diferenciação celular e expressão de fatores de crescimento em várias espécies. Entretanto, o efeito direto sobre a expressão de anexina II ainda não foi estudado.

Estrutura tridimensional da anexina II

As anexinas em vertebrados são caracterizadas pela porção N-terminal. Em geral, todas as anexinas possuem uma seqüência de 4 ou 8 repetições com aproximadamente 70 a.a. Cada seqüência possui uma região altamente conservada de 17 a.a. A anexina II é caracterizada por apresentar um sitio de ligação para a proteína S-100 (p11), além de um sitio de fosforilação serina/treonina (S) para a PK-C e ainda um sitio de fosforilação tirosina (Y) para pp60-Src (Gerke & Moss, 1997).

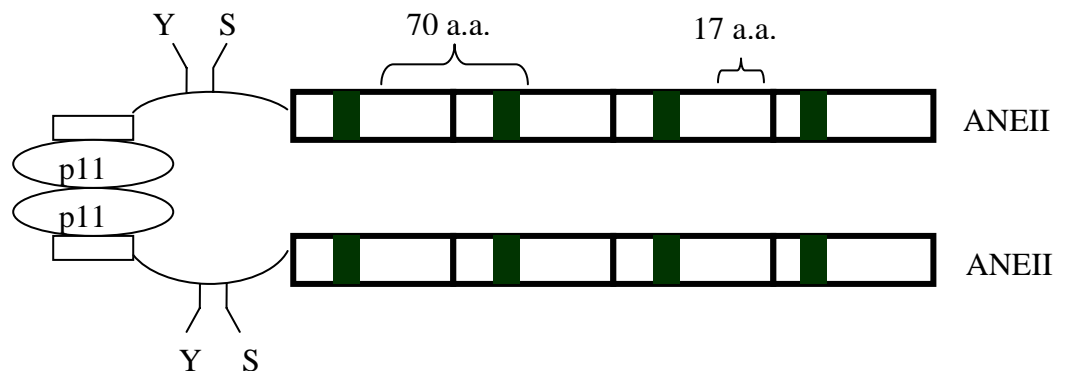


Figura 1. Estrutura do tetrâmero formado pela anexina II e p11. Os retângulos maiores representam as seqüências de repetições com 70 a.a., sendo que cada uma possui uma região altamente conservada de 17 a.a., representado pelas porções pretas. A anexina II possui os sítios de ligação para a proteína S-100 (P11), e os sítios de fosforilação S e Y para serina/treonina e tirosina respectivamente (Gerke & Moss, 1997).

Fatores de Crescimento

Vários estudos têm demonstrado a importância dos fatores de crescimento (FC) produzidos pelo ovário na maturação nuclear e especialmente no desenvolvimento embrionário, nas diferentes espécies de mamíferos. Esses FCs são produzidos no endométrio durante a fase de pré-implantação dos embriões. O IGF-I, é um FC de baixo peso molecular, e possui uma única cadeia de polipeptídios com estrutura e função similar a insulina (Singh et al., 1997). Esse FC desempenha papel importante na interação entre o endométrio uterino e concepto, tendo como característica um efeito mitogênico e estimulante do metabolismo embrionário (Simmen et al., 1993). O IGF-I é um dos componentes do soro fetal bovino (SFB), com efeito estimulatório no crescimento e proliferação de células da granulosa *in vitro* (Singh et al., 1997). Há evidências de que esse FC, melhora a expansão do cumulus oophorus, maturação de oócitos bovinos *in vitro* e desenvolvimento embrionário (Funston et al., 1996; Palma et al.,

1997; Prella et al., 2001; Moreira et al., 2002). Outra ação do IGF-I é na regulação, seleção e maturação de oócitos durante o desenvolvimento folicular *in vivo* (Yoshimura et al., 1996; Liu & Leroith, 1999).

Esse FC está presente no fluido folicular de suínos e é secretado pelas células da granulosa em resposta aos esteróides gonadais e gonadotrofinas (Armstrong et al., 1996). Na regulação folicular, o IGF-I em conjunto com o FSH, tem função autócrina na proliferação das células da granulosa e na indução da atividade esteroidogênica. Na ausência de FSH, o IGF-I é um regulador parácrino da expansão das células do cumulus oophorus e folículos pré-antrais (Armstrong et al., 1996). O meio de cultivo com altas concentrações de IGF-I, combinado com soro de vaca em estro (SVE) e células da granulosa pode incrementar o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* (Palma et al., 1997).

Em meio quimicamente definido, o uso de insulina e IGF-I incrementam o percentual de embriões que atingem o estágio de mórula (Matsui et al., 1995). A transcrição de receptor para IGF-I foi detectada em bovinos e camundongos no estágio de uma célula e oito células respectivamente. Em embriões, o uso de IGF-I suplementado ao meio de cultivo, promoveu uma melhor qualidade aos embriões (Herrler et al., 1992). Em humanos, o IGF-I tem papel importante na embriogênese, e a expressão de seus genes pode indicar a qualidade embrionária (Liu & Leroith, 1999).

Retinol

O retinol (ROL) é um álcool-lipídico com efeito biológico característico de vitamina A, encontrado naturalmente apenas no reino animal, sendo que 0,3µg de retinol equivalem a 1 UI de vitamina A (Wolf, 1984; Guillard & Lequeu, 1995). Em bovinos a fonte de vitamina A (vit A) da dieta é principalmente o β-caroteno, o qual é abundante em vegetais amarelos e verdes e faz parte de uma vasta família de carotenóides com 50 componentes aproximadamente (Wolf, 1984). O β-caroteno é clivado para formar retinol nas células do intestino delgado, pela ação da enzima caroteno 15,15'-dioxigenase (Olson, 1989; Ross, 1993), o qual passa a retinol e esse por esterificação a retinil éster (RE). O β-caroteno da dieta, após absorção intestinal e processos bioquímicos específicos, sai do intestino na forma de RE, principalmente, ou de β-caroteno, os quais são englobados por quilomicrons e entram na corrente circulatória pela via linfática, finalmente aparecendo no plasma como uma lipoproteína de baixa densidade (LDL).

As várias formas retinóicas são estocadas em torno de 80% no fígado, principalmente nos hepatócitos e células estelares. Depois do fígado, o local de maior presença é o rim, porém, provavelmente, não seja local de armazenagem, mas sim de filtragem, onde há o acúmulo de ROL livre que é esterificado. Outro local de armazenagem de ROL é o epitélio pigmentar da retina. A proteína carreadora de retinol (RBP) é uma das principais proteínas produzidas pelo endométrio e conceito de grandes animais e sua produção parece estimulada no

endométrio por um sinergismo entre conceito, baixa de estrógeno e aumento de progesterona (Harney et al., 1993; Liu et al., 1992; MacKenzie et al., 1996; Stallings-Mann et al., 1993; Thomas et al., 1992; Vallet et al., 1994).

A função celular da vit A se dá na ativação do núcleo celular para alterar a expressão da informação genética, como ocorre nas células epiteliais que têm o controle da diferenciação influenciado pela vit A. A função extranuclear ocorre no retículo endoplasmático e membrana celular. Em ambas as funções, nuclear e extranuclear, há evidências de que a vit A está envolvida na síntese de glicoproteínas, na ativação do fator de crescimento epidermal (EGF), na ligação a receptores de fibronectina, na ativação da proteína quinase-A (PK-A), na interação e adesão célula-célula, na formação de junções intercomunicantes (gap junctions) e na permeabilidade celular (Wolf, 1984; Guillard & Lequeu, 1995).

O papel do β -caroteno e do retinol sobre a função ovariana e saúde genital das fêmeas foi estudado por vários autores. Lotthammer (1979) demonstrou que a presença de β -caroteno em níveis normais é essencial para manter a fertilidade normal de fêmeas bovinas, independentemente da vitamina A. Porém, Folman et al. (1979) não encontraram efeito em vários aspectos que afetam a fertilidade, submetendo novilhas à privação de β -caroteno, mas com o fornecimento de vit A na dieta. Além disso, Shaw et al. (1995) demonstraram que o retinol é importante para a qualidade dos embriões bovinos.

Existe também um efeito inibitório da vit A no início da transformação celular carcinogênica, provocada por vírus carcinogênicos. Essa ação ocorre na superfície celular, talvez por mudança provocada pela fibronectina na cadeia de oligossacarídeos das glicoproteínas da membrana celular e alteração nos receptores da membrana (Wolf, 1984). A vit A é necessária para o desenvolvimento normal de animais jovens, atuando através de fatores de crescimento, como por exemplo, o EGF (Wolf, 1984). O retinol pode estimular de forma significativa a ligação do EGF com a célula, devido ao aumento no número de receptores (glicoproteínas) para EGF (Jetten, 1980).

Durante a espermatogênese a vit A é necessária para a produção de espermatozóides, em contrapartida a deficiência de vit A causa degeneração e atrofia do epitélio germinativo, esse processo é totalmente reversível quando uma dieta adequada de vit A é fornecida (Criswold et al., 1989). Provavelmente, existam dois caminhos distintos para o sinal de ativação gênica conferido pelo ROL ao testículo, caminhos esses que variam dependendo da localização e idade das células germinativas (Wang & Kim, 1993). Koshimuzi et al. (1995) demonstraram que a ativação do receptor para ácido retinóico (RAR) incrementa a proliferação de células germinativas, sugerindo que os genes que se ligam e são ativados por RAR podem ser componentes importantes para sobrevivência da oogônia e do oócito, prevenindo a apoptose dessas células.

A vit A (ROL) tem profundo efeito sobre o crescimento e diferenciação em vários tecidos. O ROL talvez tenha poder de modular o desenvolvimento folicular, havendo evidências de sua

participação no controle do recrutamento, seleção e crescimento do folículo dominante na vaca (Schweigert & Zucker, 1988). O desenvolvimento embrionário é um processo que tem particular sensibilidade a vit A, pois tanto a deficiência como o excesso pode levar ao aborto ou malformações embrionárias (Wolf, 1984; Guiland & Lequeu, 1995; Cui et al, 2003; Kaiser et al, 2003; Duester et al. 2003). A vit A está envolvida na diferenciação celular que ocorre no embrião. Há influência fundamental e crítica da vit A na formação e desenvolvimento do embrião e do feto (Liu et al., 1993; stallingsmann et al., 1993; Cui et al, 2003; Kaiser et al, 2003; Duester et al. 2003). Em nosso laboratório Montagner (1999) demonstrou uma maior formação de blastocisto quando utilizou retinol durante o desenvolvimento embrionário, em meio KSOM e células epiteliais do oviduto.

CAPÍTULO 2

ANNEXIN II EXPRESSION IN BOVINE OOCYTES DURING FOLLICULAR DEVELOPMENT

Será submetido ao periódico *Genetics and Molecular Biology*.

**ANNEXIN II EXPRESSION IN BOVINE OOCYTES DURING
FOLLICULAR DEVELOPMENT**

**Luis Fabiano Santos da Costa; Márcia Silveira Netto Machado; João
Francisco Coelho de Oliveira; Gustavo Zamberlan; Paulo Bayard Dias
Gonçalves¹**

Department of Large Animals, Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

Abstract

The present study was designed to investigate the annexin-II (Ann-II) expression profile during preantral follicle development and in oocytes from different antral follicle sizes (<3mm, 5-8mm e >8mm diameter). The action of retinol on the Ann-II expression in oocytes after maturation was also examined. Only secondary preantral follicles expressed Ann-II. At the germinal vesicle stage, the oocytes Ann-II expression was different among antral follicle size ($p<0.05$). Oocytes from follicles >8mm had a higher Ann-II expression as compared with follicles <3mm and follicles between 5-8mm ($p<0.05$). At metaphase II (MII), oocytes from follicles <3mm exhibited an Ann-II expression similar to that of oocytes from follicles between 5-8mm. The oocytes from follicles >8 mm had an Ann-II expression higher than those from follicles <3mm, but it did not differ from from follicles between 5 and 8mm ($p<0.05$). The retinol used during maturation increased the Ann-II expression of the experimental group

¹ Corresponding author: Departamento de Clínica de Grandes Animais, HV, CCR, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Fone/Fax: 0xx 55 220 8484, e-mail: bayard@biorep.ufsm.br

as compared to the control group ($p < 0.05$). It can be concluded that competent oocytes have a higher Ann-II expression and retinol increases the mRNA availability for Ann-II. Retinol may be involved in the regulation of oocyte competence by decreasing translation and/or mRNA degradation.

Key words: bovine oocytes, annexin II, retinol.

Introduction

The kinetics of the nuclear maturation of bovine oocytes has been extensively studied (Motlik et al, 1989; Sirard et al. 1989, Süss et al, 1988; Mondadori et al. 1999; Bortolotto et al, 2001). Bovine oocytes acquire the competence for resuming and completing meiosis after the follicle reaching between 1.7 and 2.0mm in diameter, a stage in which the oocyte has fully developed measuring 150 μ m (Motlik et al., 1990; Braw-Tal & Youssef, 1997).

The Maturation-Promoting Factor (MPF) is the key regulator in cell cycle either for meiosis or mitosis. MPF is a serine/threonine kinase protein, composed of one catalytic sub-unit (p34^{cdc2}) and one regulator sub-unit (B cyclin; Lohka et al., 1988). During development, oocytes have very low levels of p34^{cdc2}, and are unable to progress from the G2 to M phase. The active form of MPF induces the disintegration of the nuclear membrane, directing several events such as the germinal vesicle breakdown (GVBD), chromosome condensation, and reorganization of the cytoplasm during meiosis and mitosis (Parrish et al., 1992). At the end of the developmental stage, the concentration and activity of the p34^{cdc2} are high, and the oocyte then acquires meiotic competence (Wu et al.,

1997). This greater MPF expression and activity during follicle growth points to the proteins involved in the regulation of meiosis as having similar expression profiles.

In our laboratory, protein S-100 (which is involved in the cell cycle regulation) was detected in oocytes from preantral and antral follicles from cows and fetuses by immunohistochemical analyses (Costa, 1999). However, it was not studied the subtype of the S-100 protein. This raised the hypothesis that Annexin II (Ann-II), in association with protein p11 (S-100A10), is present in oocytes during follicular development to regulate oocyte growth and maturation. Annexin-II is a calcium-dependent phospholipid binding protein, significantly expressed in epithelial tissues, intestine, lung, vascular endothelium and in tissues from reproduction system, such as endometrium and ovary (Dreier et al., 1998). Annexin-II plays a regulatory role in exocytosis, endocytosis, plasminogen activation and cell adhesion (Brownstein et al., 2004; Fitzprattick, 2000). Other roles of Ann-II are immunoglobulin transport (Kristoffersen & Matre, 1996), and the ion channel activity (Burger et al., 1996). Annexin-II is associated to the protein p11 (a member of the S-100 protein family), as a tetramer, forming an active complex.

Retinol (ROL) participates in the normal development of young animal tissues, acting via growth factors such as the epidermal growth factor (EGF). The Ann-II gene expression can be regulated by vitamin A. This suggests that the genes that bind and are activated by retinoic acid receptors (RAR) may play an important role in the survival of the oogonium and of the oocyte, preventing

apoptosis (Wolf, 1984).

This study was designed to investigate (i) the Ann-II gene expression in preantral follicle and oocytes from antral follicles at different developmental stages, and (ii) the action of retinol on the Ann-II expression in mature oocytes.

Materials and Methods

Ovaries from 210 to 240 day-old bovine fetuses were collected at an abattoir and transported in TCM199 at 30°C, in an isothermic container. Fetal ages were established following Rüsse (1983), correlating the cranio-caudal length of the bovine fetus to a day-based pregnancy time. Preantral follicles were isolated using the method by Figueiredo et al., (1993) changed by Carámbula et al., (1999). Follicles were sorted for size as primordial, primary, and secondary (Hulshof et al., (1999), using a micrometer and an inverted microscope (IM35). One hundred follicles from each class were pooled for extracting RNA and, then, recovering cDNA .

The collections of tertiary follicle oocytes were from ovaries, obtained at an abattoir. Ovaries were transported to the laboratory in 0.9% NaCl at 30°C in an isothermic container. In the laboratory, ovaries were washed twice in the same solution, and then kept in double bath at 30°C. Follicles of 3mm, between 3 and 5mm and larger than 8mm in diameter were aspired, separately. Only oocyte-cumulus complexes (COCs) classified as grade I were selected. COCs were characterized as compact cumulus, complete cumulus, and homogeneous cytoplasm with fine granulosa cells. Non-matured COCs of each follicle category

underwent mechanical agitation to disrupt cumulus cells. Subsequently, denuded oocytes were washed twice with TCM199 medium supplemented with Earle salts, L-glutamine, 25mM Hepes (Sigma), 0.2mM sodium pyruvate, 100 IU penicillin/mL, 50 µg streptomycin/mL, and 1.0 mg polyvinyl alcohol (PVA)/mL. A set of 10 oocytes per follicle category was used in three replications.

COCs from different follicle categories were cultured in TCM199 medium supplemented with Earle salts, L-glutamine, 25mM Hepes (Sigma), 0.2mM sodium pyruvate, 26.19 mM sodium bicarbonate, 100 IU penicillin/mL, 50 µg streptomycin/mL, and 1.0 mg polyvinyl alcohol/mL (PVA, TCM-PVA). COCs were cultured for 24 h, at 39°C in a 5% CO₂/saturated humidity atmosphere, whereupon COCs underwent mechanical agitation as before. In order to validate the results of the mature oocytes, a set of oocytes from the each and same follicle category was fixed onto slides in 1:3 acetic acid/methanol for 24h and then stained with Lacmoid 1% in 45% acetic acid with PBS (Vignola et al., 1994).

RNA was extracted from preantral follicles and oocytes using the RNeasy® Mini kit (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA, USA). Briefly, after successive washes in PBS, the preantral follicles and oocytes were transferred to a 1.5-ml centrifuge tube containing 350 µl RLT buffer plus 3.5 µl β-mercaptoethanol and mechanically shaken for 15 s, and 350 µl 70% ethanol was added. After homogenization, the content of the tube was transferred to an RNA extraction mini-column and centrifuged for 15 s. Next, 700 µl RW1 buffer was added and the column was centrifuged for 15 s, followed by two washes with 500 µl RPE buffer (REP supplemented with 100% ethanol, 1:4) and by a last centrifugation

for 2 min for total drying of the column. The column was then transferred to a new tube, 40 μ l ultrapure water was added, and the tube was centrifuged for 1 min for dilution of the RNA. All centrifugations were performed at 8000 g.

SensiscriptTM Reverse Transcriptase kit (QIAGEN Inc.) was used to isolate cDNA. Each RT-PCR mixture contained 2.0 μ l buffer, 2.0 μ l dNTP, 2.0 μ l oligoDT-primer, 0.25 μ l Rnase inhibitor, 1.0 μ l Sensiscript enzyme, and 12.5 μ l of the RNA extraction product. The reaction was carried out in a thermocycler at 37°C for 1 hour and the reaction product was stored at -18°C until the time for use.

The primers for Ann-II were synthesized by Invitrogen Life Technologies. The constitutive GAPDH gene was used as control in the RNA extraction reaction. The following primer oligonucleotide sequences were used: forward 5' CCTCCAAGTGCATACGGG 3' and reward 5' TCATACTGAGCAGGTGTTTT 3' for Ann-II, and forward 5' TGTTCAGTATGATTCCACCC3' and reward 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3' for GAPDH. The PCR mixture contained 17.5 μ l ultrapure water, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 250 μ M of each dNTP, 0.4 μ M of each primer, 2.5 U Taq DNA polymerase, and 3 μ l cDNA, in a final volume of 25 μ l. Amplification was performed in a thermocycler under the following conditions: 94°C for 5 min, 94°C for 1 min, 60°C for 1 min for the Ann-II primers or 54°C for 45 s for the GAPDH primers, and 72°C for 1 min. Steps 2-4 were repeated according to the exponential phase, with 34 cycles for Ann-II and 31 cycles for GAPDH, followed by a final extension at 72°C for 5 min. The relative amount of transcript was compared

between groups based on the amplification results comparing the constitutive gene (GAPDH) and the Ann-II gene.

The PCR product was visualized on 2% agarose gel in TBE (0.5 M EDTA, pH 8.0, 0.09 M Tris, 0.09 M boric acid) stained with ethidium bromide under ultraviolet light. The data for semiquantitative analysis of gene expression were obtained by capturing the gel images with a digital camera and recorded with the Alpha DigiDoc 1000 program to obtain arbitrary values.

Only samples in which the constitutive GAPDH gene was detected, indicating that mRNA extraction and cDNA isolation were effective, were used in all analyses. The semiquantitative gene expression results were analyzed by ANOVA. Gene expression in preantral follicle at different stages of development was only described regarding the presence or absence of expression, and no statistical analysis was performed.

Results and Discussion

The Ann-II gene expression was observed in secondary follicles, but not in primordial and primary follicles. According to our knowledge, this is the first report demonstrating the expression of Ann-II in bovine preantral follicle. Preantral follicles express several proteins important for the follicle and oocyte development (van Wezel & Rogers, 1996). However, the factors and mechanism involved in primordial follicle activation are not completely understood. In this regard, Ann-II is probably not involved in the activation of primordial follicles because it was not detected in the early stages of follicular development. Besides

the fact that the amount of transcript obtained was below the detection threshold for the method that was used, the Ann-II expression cannot be ruled out.

The expression of the constitutive gene GAPDH was used as the control in the assessment of the Ann-II gene expression in oocytes from different follicles size. The correlation between the GAPDH and Ann-II expressions was the basis for the analyses. At the germinal vesicle stage (GV), oocytes from different follicle size were mutually different ($p < 0.05$) for Ann-II expression. Oocytes recovered from follicles < 3 mm and from 5-8 mm exhibited a lower ($p < 0.05$) Ann-II expression, when compared with oocytes from follicles > 8 mm (Figure 1). Apparently, Ann-II plays a favorable role in the processes of oocyte competence and capacity. Oocytes remain in the first meiotic division prophase upon a little before ovulation. The proteins responsible for this increase in size are synthesized during oocyte growth phase. As development is completed, soon after the follicular antrum formation, oocytes acquire competence necessary to restart the first meiotic division, but not the complete capacity. The more significant Ann-II expression in oocytes from follicles > 8 mm points to Ann-II as an important protein in oocyte capacity.

At MII, oocytes from < 3 mm follicles had a lower Ann-II expression than oocytes from > 8 mm follicles ($p < 0.05$), but did not differ from oocytes recovered from 5-8 mm follicles (Figure 1). In addition, the oocyte Ann-II expression from 5-8 mm follicles did not differ from those obtained of follicles > 8 mm (Figure 1).

These data underline the evidence that Ann-II may be involved in the process of oocytes capacity, since oocytes from follicles larger than 8 mm are

more capable to reach the blastocyst stage, when compared with oocytes from smaller follicles.

The use of retinol during maturation promoted an increase in the Ann-II mRNA, when compared to the control sample ($p < 0.05$, Figure 2). Retinol has been tested for its ability to regulate protein synthesis in several tissues in different species. As the gene expression occurs only during the first hour of maturation, these results indicate that retinol may have heightened transcription at the beginning of maturation, or lessened the degradation of Ann-II mRNA.

Although retinol does not affect the kinetics of oocyte maturation, the compound has been confirmed able to increase significantly the cleavage rate in a chemically defined environment (Bortolotto et al., 2001). It is possible that retinol is capable to change the gene expression or translation during maturation, which could influence fertilization capacity and embryo development. The resumption and progression of meiosis depends on intracellular oscillations in Ca^{+} (Kline, 1996), which induces the degradation of MPF. A single oscillation in Ca^{+} is enough to bring about the GVBD (Wu et al., 1997). Ann-II is a protein that takes part in the activity of oocyte calcium channels (Dreier et al., 1998), and may be an important factor in oocyte competence and capacity.

In conclusion, capacitated oocytes exhibited a higher Ann-II expression. Also, retinol increases Ann-II mRNA availability, and may be involved in the regulation of oocyte competence by lessening translation or preventing degradation.

References

BORTOLOTTO, E.B.; GONÇALVES, P.B.D.; NEVES, J.P.; COSTA, L.F.S., MACIEL, M.N.; MONTAGNER, M.M.; FARIAS A.M.; STRANIERI, P. Fator de crescimento derivado das plaquetas, retinol e insulina na regulação da maturação nuclear de oócitos bovinos e suas conseqüências no desenvolvimento embrionário. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.**, v.53, n.2, p.191-197, 2001.

BRAW-TAL, R., YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility** v. 109, p. 165-171, 1997.

BROWNSTEIN, C., DEORA, A.B., JACOVINA, A.T., WEINTRAUB, R. GERTLER, M., KHAN, K. M. F., FALCONE, D.J. and HAJJAR, K.A. Annexin II mediates plasminogen-dependent matrix invasion by human monocytes: enhanced expression by macrophages. **Blood**, v. 103, 317-324, 2004.

BURGER, A., BERENDES, R., LIEMANN, S., BENZ, J., HOFMANN, A., GOTTIG, P., HUBER, R., GERKE, V., THIEL, C., ROMISCH, J., WEBER, K. Identification of binding domains in the sodium channel NaV1.8 intracellular N-terminal region and annexin II light chain p11 **J. Mol. Biol.** 257, 839-847, 1996.

CARÁMBULA, S.F., GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R., NEVES, J.P., COSTA, L.F.S. Dissociação mecânica de ovários de fetos bovinos para isolamento de folículos pré-antrais. In: XI CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 1996. Canela, RS. **Anais...** Porto Alegre: Arq. Fac. Vet. UFRGS. 273 p.p. 235.

COSTA, L.F.S. Desenvolvimento de folículos pré-antrais e imunohistoquímica de células ovarianas *in vitro* e *in situ* Santa Maria - RS. 68 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 1999.

DREIER, R., SCHMID, K.W., GERKE, V., RIEHEMANN, K. Differential expression of annexins I, II and IV in human tissues: an immunohistochemical study. **Histochem Cell Biol**, v. 110, p. 137-148, 1998.

EPPIG, J.J., SHROEDER, A. C. Capacity of mouse from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization in vitro. **Biol. Reprod.** v. 41, p.268-276, 1989.

FIGUEIREDO, J. R., HULSHOF, S.C.J., VAN DEN HURK, R., ECTORS, F.J., FONTES R.S., NUSGENS, B., BEVERS, M.M., BECKERS J.F. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology** v. 40, p. 789-799, 1993.

FITZPATRICK, S. L., KASSAM, G., CHOI, K. S., KANG, H. M., FOGG, D. K., and WAISMAN, D. M. Regulation of Plasmin Activity by Annexin II Tetramer **Biochemistry** 39, 1021–1028, 2000.

HULSHOF, S. C., FIGUEIREDO, J. R., BECKERS, J. F., BEVERS, M. M. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **The veterinary quarterly.** v. 16, n. 2, p. 78-80, 1994.

KLINE, D. Activation of the mouse egg. **Theriogenology**, v. 45, p. 81-90, 1996.

KRISTOFFERSEN, E. K., and MATRE, R. Surface annexin II on placental membranes of the fetomaternal interface. **Am. J. Reprod. Immunol.** v. 36, p. 141-149, 1996.

LOHKA, M.J., HAYES, M.K., MALLER, J.L. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 85, p. 3009-3013, 1988.

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

MONDADORI, R.G.; GONÇALVES, P.B.D., NEVES, J.P., COSTA, L.F.S., MONTAGNER, M.M.; CARÁMBULA, S.F., BORTOLOTTI, E.B. Fecundação e clivagem após a ativação da proteína quinase C durante a maturação de oócitos bovinos. **Ciência Rural**, v.29, n.1, p. 105-110, 1999.

MOTLÍK, J. Cytoplasmic aspects of oocyte growth and maturation in mammals. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 38, p. 17-25, 1989.

MOTLÍK, J., KUBELKA, M. Cell cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 27, p. 366-375, 1990.

PARRISH, J.J., KIM, C.L., BAE, I.H. Current concepts of cell-cycle regulation and its relationship to oocyte maturation, fertilization and embryo development. **Theriogenology**, v. 38, p. 277-296, 1992.

PAVLOK, A., LUCAS-HAHN, A. and NIEMAN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 31, p. 63-67, 1992.

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca anat.** v. 24, p. 77-92, 1983.

SIRARD, M.A., FLORMAN, H.M., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., et al. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic

maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 1257-1263, 1989.

SUSS, U., WUTHRICH, K., STRANZINGER, G. Chromosome configurations and time sequence of first meiotic division in bovine oocytes matured *in vitro*. **Biology of Reproduction** v.38, p.871-880,1988.

VIGNOLA, A.G.H., PRADO, A.D., VALENTE, A., RUBIM, M.I.B., GONÇALVES, P.B.D. Técnicas de coloração cromossômica para estágios específicos da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Ciência Rural**, v. 24, n. 3, 1994.

van WEZEL, I., RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1003-1011, 1996.

WOLF, G. Multiple Functions of Vitamin A. **Physiological Reviews**, v. 64, p. 873-936, 1984.

WU, B., IGNOTZ, G., CURRIE, YANG X. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 253-259, 1997.

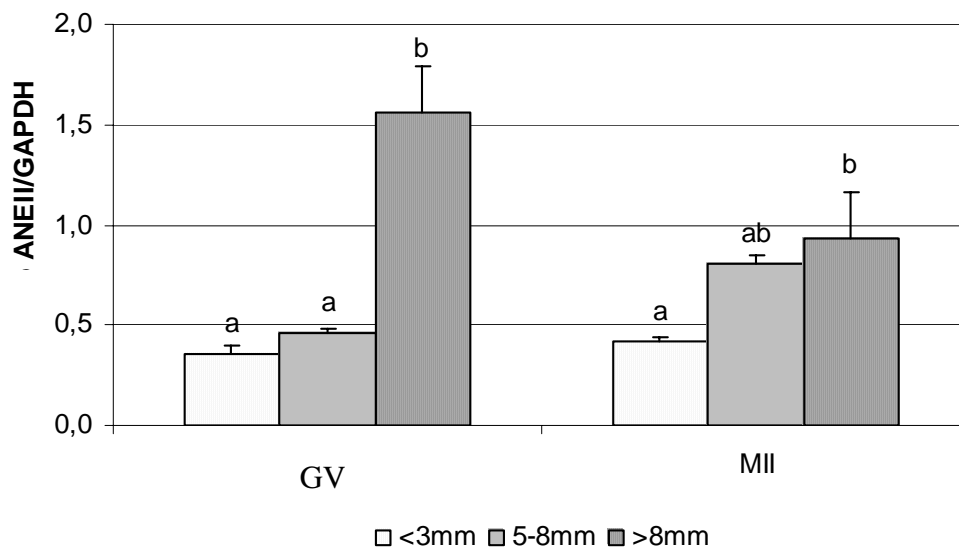


Figure 1: Semi-quantitative analysis of the Ann-II gene expression in oocytes from different follicle size (<3mm, 5-8mm, >8mm), at germinal vesicle (GV) and metaphase II (MII) stages. Data are shown as mean and standard error of the mean. Different letters in the same stage indicate statistical difference (p<0.05).

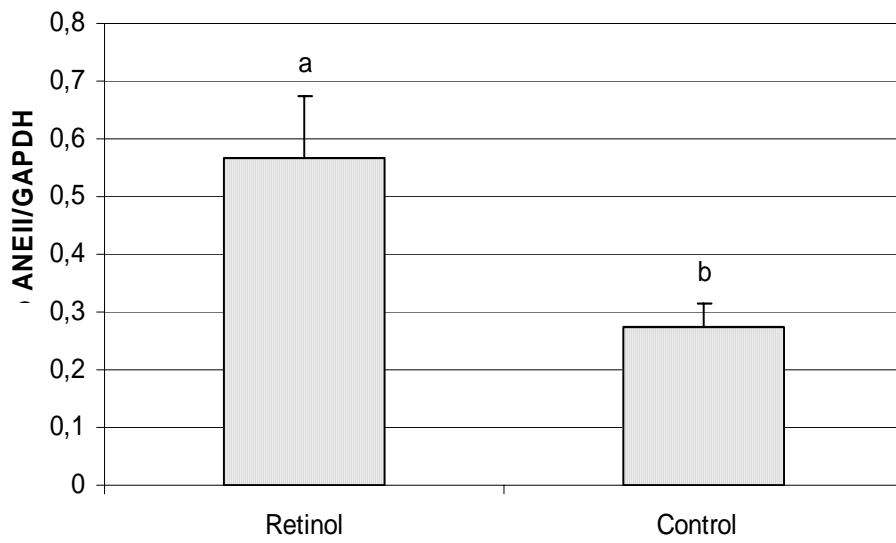


Figure 2: Semi-quantitative Ann-II expression in oocytes matured for 24h, without (control sample) and supplemented with 1ng retinol/mL (treatment group) in culture medium. The data are shown as mean and standard error of the mean. Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$).

CAPÍTULO 3

PROFILE AND REGULATION OF ANNEXIN II EXPRESSION DURING EARLY EMBRYOGENESIS IN CATTLE

Será submetido ao periódico *Animal Reproduction Science*

PROFILE AND REGULATION OF ANNEXIN II EXPRESSION DURING EARLY EMBRYOGENESIS IN CATTLE

Costa, L.F.S.²; Machado, M.S.N.²; Oliveira, J.F.C.³; Silva, J.C. da ⁴; Gonçalves,
P.B.D.⁵

¹ Corresponding author: Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Clínica de
Grandes Animais, HV, Fone/Fax: 0xx 55 220 8484, e-mail: bayard@biorep.ufsm.br

Abstract

The *in vitro* production of bovine embryos shows a low blastocyst production rate and wide variability in the results. The mechanisms of cell cycle regulation in embryos are still poorly understood. The objective of the present study was to determine the presence of annexin II (Ann-II) during the initial phases of bovine embryo development and to study the regulation of Ann-II expression by retinol and insulin-like growth factor I (IGF-I). Bovine embryos at different stages of development were produced *in vitro* on SOF medium alone or SOF supplemented with retinol and IGF-I. The embryos were processed for mRNA extraction, cDNA isolation and PCR using Ann-II-specific oligonucleotides. Ann-II was detected in all stages of early embryo development, except for the 16-cell stage. The administration of retinol during embryo development caused a significant increase ($p < 0.05$) in blastocyst production determined on day 6 after fertilization compared to the control and IGF-I groups. In the control group, the percentage of blastocysts in relation to the total number of cultured oocytes was 20.5% (24/117), which did not differ from that obtained for the IGF-I group (25.8%, 24/93), whereas a significantly higher blastocyst rate

(37.8%, 45/119; $p < 0.05$) was observed in the retinol group. Semiquantitative analysis of Ann-II expression in embryos produced in medium supplemented with IGF-I (10 ng/ml medium) or retinol (0.1 ng/ml medium) revealed a lower expression of this gene when these substances were present in the medium compared to control ($p < 0.05$). Semiquantitative expression of Ann-II did not differ between the retinol and IGF-I groups. *In vitro* embryo production is increased in the presence of retinol, which acts by modulating the expression of Ann-II during embryo development. The decrease in Ann-II expression during bovine embryogenesis causes a qualitative and quantitative increase of *in vitro* embryo production.

Key words: annexin II, embryo development, cattle.

INTRODUCTION

In vitro production of bovine embryos has been one of the most widely used biotechnologies in the last decade and represents one of the main tools for the multiplication of genetic material. Rates of oocyte maturation, cleavage and embryo development up to the blastocyst stage have been reported to be approximately 92, 77 and 40%, respectively (Greve et al., 1993; Carolan et al., 1995; Liu & Foote, 1995), and continue at these levels, with wide variation being observed due to the use of substances of unknown composition such as estrous cow serum (ECS) or fetal bovine serum (FBS). In addition, pregnancy outcomes are still below the rates obtained with the traditional embryo transfer system. The

pregnancy rates obtained with grade 1 embryos produced *in vitro* and transferred fresh (30-60%) or frozen (5-40%) are lower than those obtained with embryos produced *in vivo* (fresh, 50-80% or frozen, 40-70%) (Hasler, 1996). In cattle, the embryonic genome is activated during the fourth cycle of cell division, and a large number of both *in vivo* and *in vitro* embryos stop their development during this phase. Probably, certain cell division-related genes are involved in this 8-16-cell block. .

The regulation of cell cycle progression is a complex process involving kinase cascades and the action of proteases and second messengers, among other factors. Evidence indicates that the intracellular calcium concentration plays a crucial role in these events. Transport-related and calcium-dependent proteins may be important components in the division process and in the control of embryo cleavage block. Modifications in calcium concentrations occur throughout all phases of the cell cycle and are observed together with the resumption of meiosis and at the end of oocyte maturation. Although the mechanism whereby the spermatozoon triggers the activation of the oocyte is still a matter of controversy (Fissore et al., 1998), there is no doubt that the onset of embryogenesis depends on oscillations in intracellular calcium ion concentration (Swann & Ozil, 1994; Kline, 1996). A large number of proteins have been indicated as mediators of the Ca^{2+} effect during the cell cycle, for example the S-100 proteins which regulate the activity of p53, a tumor suppressor that modulates the expression of genes fundamental to cell cycle progression.

Another Ca^{2+} -related protein is annexin II (Ann-II) which, together with Mbh1, is responsible for the binding of DNA sequences to replisomes and is considered to be important during DNA replication. Ann-II is a strong candidate to play a role in initial cell division in embryos since this protein has been shown to be present during the process of oocyte capacitation (Costa et al., submitted). However, no data regarding the expression of Ann-II during early embryo development are available.

During embryo development, growth factors produced especially by the endometrium during the preimplantation stage (Fischer et al., 1993) play a fundamental role in the regulation of embryo metabolism and also exert a mitogenic effect (Simmen et al., 1993). Insulin-like growth factor I (IGF-I) is a low molecular weight growth factor consisting of a single polypeptide chain, with a structure and function similar to insulin (Singh et al., 1997). The use of a culture medium containing high concentrations of IGF-I in combination with ECS and granulosa cells has been shown to improve the development of bovine embryos *in vitro* (Palma et al., 1997). In humans, the expression of IGF-I genes is an indicator of embryo quality (Liu & Leroith, 1999).

Retinol is a lipid alcohol with the characteristic biological effect of vitamin A, and has been demonstrated to exert an important effect on embryo quality (Shaw et al., 1995). Vitamin A is necessary for the normal development of young animals and acts through growth factors such as EGF (Wolf, 1984). The process of embryo development is particularly sensitive to vitamin A, since both deficient and excess vitamin levels can cause abortion or embryonic

malformations (Wolf, 1984; Guillard & Lequeu, 1995; Cui et al., 2003; Kaiser et al., 2003; Duester et al., 2003). Vitamin A has a fundamental and critical influence on the formation and development of the embryo and fetus (Liu et al., 1993; Stallings-Mann et al., 1993; Cui et al., 2003; Kaiser et al., 2003; Duester et al., 2003). In our laboratory, Montagner (1999) demonstrated greater blastocyst formation when using retinol during embryo development. Thus, the interaction between growth factors and substances with a marked effect on embryo development such as retinol might regulate the expression of certain genes important in cell division and in the control of 8-16-cell block.

The aim of the present study was to investigate the expression of Ann-II during the first stages of embryo development and the regulation of this expression in blastocysts by IGF-I and retinol.

MATERIAL and METHODS

Bovine ovaries were collected at an abattoir and transported in an isothermic container in 0.9% NaCl for transport. In the laboratory, the ovaries were washed three times in the same solution. Follicles measuring 2 to 8 mm in diameter were immediately punctured with a vacuum pump connected to an 18G needle and follicular fluid was collected into a 10-ml test tube. Only cumulus–oocyte complexes (COCs) classified as grade I (according to the International Embryo Transfer Society), which are characterized by a compact and complete cumulus and homogenous cytoplasm containing thin granulations, were used.

The oocytes were maintained in follicular fluid until the time for selection to prevent resumption of meiotic division. After selection, 25 COCs in 200 μ l maturation medium were randomly distributed on Petri dishes (60 mm) under silicone oil. The maturation medium consisted of TCM-199 containing Earle salts and L-glutamine supplemented with 25 mM HEPES, 100 IU/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, 0.2 mM sodium pyruvate, 26.19 mM sodium bicarbonate, 10% FBS, 0.5 μ g/ml FSH, and 5.0 μ g/ml LH. The plates were incubated at 39°C in a 5% CO₂ atmosphere with saturated air humidity for 24 hours. A pool of frozen semen of a single lot derived from sires of European breeds was used throughout the experiment. Straws of semen were thawed and washed by centrifugation through a Percoll gradient (45%/90% [v/v]) at 900 x g for 30 min. The COCs were fertilized by the addition of spermatozoa to the drops at a final concentration of 2×10^6 spermatozoa/ml medium. Heparin (10 μ g/ml medium) was added for sperm capacitation, and the plates were incubated for 20 hours under the same conditions as described for oocyte maturation. After this period, cumulus cells were removed from presumptive zygotes by mechanical shaking and transferred to embryo development medium. In the first phase of the experiment, presumptive zygotes were cultured in 200- μ l drops of synthetic oviduct fluid (SOF) supplemented with 10% FBS in a 5% O₂/5% CO₂ atmosphere at 39°C for different periods of time according to the phase when development was interrupted, i.e., 2, 4, 8, 16 and 32 cells, blastocyst or expanded blastocyst. In the second part of the experiment, after removal of the cumulus cells, presumptive zygotes were randomly divided into

three groups: SOF supplemented with 10 ng/ml IGF-I, SOF supplemented with 0.1 ng/ml retinol, and SOF medium only (control group), and incubated for 6 days under the same conditions.

RNA was extracted from the embryos using the RNeasy® Mini kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA). Briefly, after successive washes in PBS, the embryos were transferred to a 1.5-ml centrifuge tube containing 350 µl RLT buffer plus 3.5 µl β-mercaptoethanol and mechanically shaken for 15 s, and 350 µl 70% ethanol was added. After homogenization, the content of the tube was transferred to an RNA extraction mini-column and centrifuged for 15 s. Next, 700 µl RW1 buffer was added and the column was centrifuged for 15 s, followed by two washes with 500 µl RPE buffer (REP supplemented with 100% ethanol, 1:4) and by a last centrifugation for 2 min for total drying of the column. The column was then transferred to a new tube, 40 µl ultrapure water was added, and the tube was centrifuged for 1 min for dilution of the RNA. All centrifugations were performed at 8000 g.

Sensiscript™ Reverse Transcriptase kit (Qiagen Inc.) was used to isolate cDNA. Each RT-PCR mixture contained 2.0 µl buffer, 2.0 µl dNTP, 2.0 µl oligoDT-primer, 0.25 µl Rnase inhibitor, 1.0 µl Sensiscript enzyme, and 12.5 µl of the RNA extraction product. The reaction was carried out in a thermocycler at 37°C for 1 hour and the reaction product was stored at -18°C until the time for use.

The primers for Ann-II were synthesized by Invitrogen Life Technologies. The constitutive GAPDH gene was used as control in the RNA extraction

reaction. The following primer oligonucleotide sequences were used: forward 5' CCTCCAAGTGCATACGGG 3' and reward 5' TCATACTGAGCAGGTGTTTT 3' for Ann-II, and forward 5'TGTTCCAGTATGATTCCACCC3' and reward 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3' for GAPDH. The PCR mixture contained 17.5 µl ultrapure water, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 250 µM of each dNTP, 0.4 µM of each primer, 2.5 U Taq DNA polymerase, and 3µl cDNA, in a final volume of 25 µl. Amplification was performed in a thermocycler under the following conditions: 94°C for 5 min, 94°C for 1 min, 60°C for 1 min for the Ann-II primers or 54°C for 45 s for the GAPDH primers, and 72°C for 1 min. Steps 2-4 were repeated according to the exponential phase, with 34 cycles for Ann-II and 31 cycles for GAPDH, followed by a final extension at 72°C for 5 min. The relative amount of transcript was compared between groups based on the amplification results comparing the constitutive gene (GAPDH) and the Ann-II gene.

The PCR product was visualized on 2% agarose gel in TBE (0.5 M EDTA, pH 8.0, 0.09 M Tris, 0.09 M boric acid) stained with ethidium bromide under ultraviolet light. The data for semiquantitative analysis of gene expression were obtained by capturing the gel images with a digital camera and recorded with the Alpha DigiDoc 1000 program to obtain arbitrary values.

Only samples in which the constitutive GAPDH gene was detected, indicating that mRNA extraction and cDNA isolation were effective, were used in all analyses. The semiquantitative gene expression results were analyzed by ANOVA. The data regarding percent embryo production were analyzed with the

PROC CATMOD program of the SAS statistical software and treatments were compared by contrast. Gene expression in embryos at different stages of development was only described regarding the presence or absence of expression, and no statistical analysis was performed.

RESULTS

The expression of the Ann-II gene in embryos at different stages of development is shown in Figure 1. Ann-II was detected in the 2-, 4- and 8-cell stages. No expression of Ann-II was observed in 16-cell embryos, while the transcription of this gene was reinitiated in the 32-cell stage. Ann-II was also detected in the morula, blastocyst and expanded blastocyst stages.

The presence of retinol during embryo development led to a significant increase ($p < 0.05$) in blastocyst production determined on day 6 after fertilization compared to the control and IGF-I groups. In the control group, the percentage of blastocysts in relation to the total number of cultured oocytes was 20.5% (24/117), which did not differ from that obtained for the IGF-I group (25.8%, 24/93), whereas a higher blastocyst rate (37.8%, 45/119; $P < 0.05$) was observed in the retinol group (Figure 2).

Semiquantitative analysis of Ann-II expression in embryos produced on medium supplemented with IGF-I (10 ng/ml medium) or retinol (0.1 ng/ml medium) revealed a lower expression of this gene when these substances were present in the medium compared to control ($p < 0.05$; Figure 3). Semiquantitative expression of Ann-II did not differ between the retinol and IGF-I groups.

DISCUSSION

This is the first report demonstrating the expression of Ann-II in bovine embryos. Data regarding the expression of this gene in animals of commercial interest are very scarce, with studies only reporting the presence of this protein in amphibian embryos (Izant & Brysons, 1991) and of a sequence homologous to a protein associated with Ann-II in fish (Bobe & Goetz, 2000). In amphibians, this protein was detectable during all phases of oogenesis and also during embryo development. The same profile was observed in the present study, except for 16-cell embryos. The 8-16-cell block is characterized by a longer cell cycle during the preimplantation period and coincides with the initiation of transcription under the control of the embryonic genome (Telford et al., 1990). In the present study, transcription of the maternal Ann-II gene was still observed even during the block stage (8 cells).

The present study demonstrated the beneficial effect of supplementation of the embryo development medium with retinol, in agreement with previous studies in which the use of retinol promoted a significant increase of blastocyst production in KSOM medium on an oviduct epithelial cell monolayer in a atmosphere of 5% CO₂ in air (Montagner, 1999). The present results were obtained using SOF medium without oviduct cells in a different atmosphere (5% CO₂, 5 % O₂, 90% N₂). Retinol possesses antioxidant activity, minimizing cell membrane lipid peroxidation (Dobreanu & Mody, 1997), which is damaging to

embryonic cells. In addition, retinol acts by preventing apoptosis, thus altering the cascades of events of this process (Koshimuzi et al., 1995).

Another important result is related to the season of the year when the experiment was performed. Blastocyst production rates obtained during a period of mild climate with regular rainfall and a greater offer of pasture are higher than those observed in the present study which was performed between April and June. It is possible that the blastocyst production rates observed for the control group were influenced by the nutritional status of the oocyte donor animals, because they are normally higher; however, retinol supplementation minimized these effects. The use of retinol to improve *in vitro* embryo production rates seems to be increasingly accepted, with studies demonstrating that retinol is important for embryo development, especially in seasons in which wide variability in the results is observed.

Semiquantitative analysis of Ann-II expression in blastocysts produced on SOF medium (control) or SOF supplemented with 10 ng/ml IGF-I or 0.1 ng/ml retinol (IGF-I and retinol groups, respectively) revealed that the expression of this gene was reduced when retinol or IGF-I was present. Ann-II was detected during all initial stages of embryo development. However, the positive results obtained with retinol seem to be related to the modulation of Ann-II expression. Ann-II seems to play a negative role during this stage since embryo production increased qualitatively (data not shown) and quantitatively when the development medium was supplemented with IGF-I or retinol, respectively. Ann-II plays a role in

embryogenesis, but a decrease in the expression of this protein in cattle caused a qualitative and quantitative increase of *in vitro* embryo production.

REFERENCES

- BOBE, J., GOETZ, F.W. A S100 homologue mRNA isolated by differential display PCR is down-regulated in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) postovulatory ovary. **Gene**, v. 257, p. 187-194, 2000.
- CAROLAN, C., LONERGAN, P., VAN LANGENDONCKT, A., MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology**, v. 43, p. 1115-1128, 1995.
- COSTA, L.F.S.; MACHADO, M.S.N.; OLIVEIRA, J.F.C.; ZAMBERLAN, G.; GONÇALVES, P.B.D. Gene expression of annexin II in bovine oocytes during follicular development. **Genetics and Molecular Biology**, v. submitted,.
- CUI, J., MICHAILE, J., JIANG, W. and ZILEA, M.H. Retinoid receptors and vitamin A deficiency: differential patterns of transcription during early avian development and the rapid induction of RARs by retinoic acid. **Developmental Biology**, v. 260, p. 496–511, 2003.
- DUESTER, G., MIC, F.A., MOLOTKOV, A. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. **Chemico-Biological Interactions**, v. 143, p. 201-210, 2003.

FISSORE, R.A. and VANDE WOUDE, G.F. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1261-1270, 1996.

GREVE, T., MADISON, V., AVERY, B., CALLESEN, H. HYTTEL, P. In vitro production of bovine embryos: A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations. **Animal Reproduction Science**, v. 33, p. 51-69, 1993.

GUILLAND, J.C. and LEQUEU, B. As vitaminas: do nutriente ao medicamento. Santos Livraria, São Paulo, 357 p., 1995.

HASLER, J.F. Commercial production of in vitro-derived bovine embryos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 24, p. 117-134, 1996 (Suppl.).

IZANT, J.G. AND BRYSONS, L.J. Xenopus annexin II (calpactin I) heavy chain has a distinct amino terminus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 18560-18566, 1991.

KAISER, M.E., MERRILL, R.A., STEIN, A.C., BREBURDA, E. and CLAGETT-DAMEA, M. Vitamin A deficiency in the late gastrula stage rat embryo results in a one to two vertebral anteriorization that extends throughout the axial skeleton. **Developmental Biology** v. 257, p. 14-29, 2003.

KLINE, D. Activation of the mouse egg. **Theriogenology**, v. 45, p. 81-90, 1996.

KOSHIMIZU, U.; WATANABE, M.; NAKATSUJI, N. Retinoic acid is a potent growth activator of mouse primordial germ cells in vitro. **Developmental Biology**, v. 168, p. 683-685, 1995.

LIU, H.K.; DORÉ, E.J.J.; ROBERTS, P.M.; KRISHNAN, R.; HOPKINS, M.F.; GODKIN, D.J. Expression and cellular localization of retinol-binding protein messenger ribonucleic acid in bovine blastocysts and extraembryonic membranes. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 393-400, 1993.

LIU, Z., FOOTE, R.H. Development of IVM/IVF bovine embryos in KSOM, TCM-199 and MENEZO B₂ with and without taurine. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 1 (Suppl.), 1994.

LIU, J-L. and LEROITH, D. Insulin-like growth factor I is essential for postnatal body growth in response to growth hormone. **Endocrinology**, v. 140, p. 5178–5184, 1999.

MONTAGNER, M.M. Produção *in vitro* de embriões bovinos com meios congelados, hepes e retinol. 68 p. Master's thesis in Veterinary Medicine Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 1999.

PALMA, G., A, MÜLLER, M., BREM, G. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.**, v.110, p.347-353, 1997.

SHAW, W.D.; FARIN, P.W.; WASHBURN, S.P.; BRITT, H.J. Effect of retinol palmitate on ovulation rate and embryo quality in superovulated cattle.

Theriogenology, v. 44, p. 51-58, 1995.

SIMMEN, R. C. and SIMMEN, F.A. Insulin-like growth factors and blastocyst development. **Theriogenology**, v. 39, p. 163-175, 1993.

SINGH, B., and ARMSTRONG, D.T. Insulin-like growth factor-I, a component of serum that enables porcine cumulus cells to expand in response to follicle-stimulating hormone *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.56, p.1370-1375, 1997.

STALLINGS-MANN, L.M.; TROUT, E.W.; ROBERTS, M.R. Porcine uterine retinol-binding proteins are identical gene products to the serum retinol-binding protein. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 998-1005, 1993.

SWANN, K. and OZIL, J.P. Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. **International Review of Cytology**, v. 152, p. 183-222, 1994.

WOLF, G. Multiple functions of vitamin A. **Physiological Reviews**, v. 64, p. 873-936, 1984.

Figure 1. Representative gel showing the expression of the Ann-II gene in embryos at different stages of development. C: control; 2cel, 4cel, 8cel, 16cel and 32cel: 2, 4, 8, 16 and 32 cells, respectively; MO: morula; BL: blastocyst; BX: expanded blastocyst.

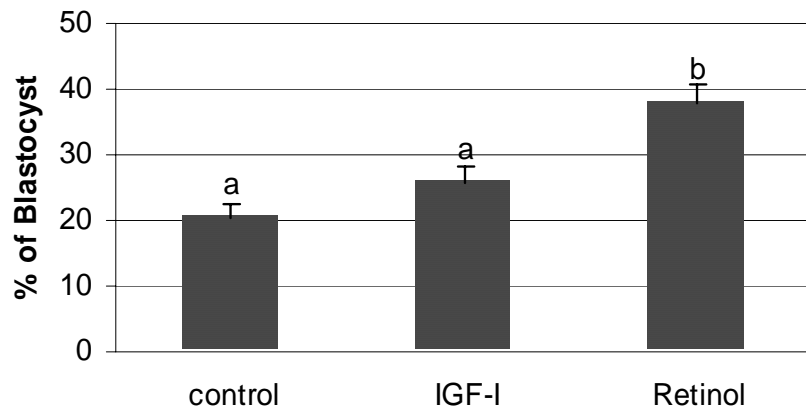


Figure 2. Percentage of embryos obtained in relation to the total number of cultured oocytes. The embryos were cultured on SOF medium (control) or SOF supplemented with 10 ng IGF-I/ml medium or 0.1 ng retinol/ml medium. The data represent the results of 4 replicates and are reported as mean and standard error of the mean. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$).

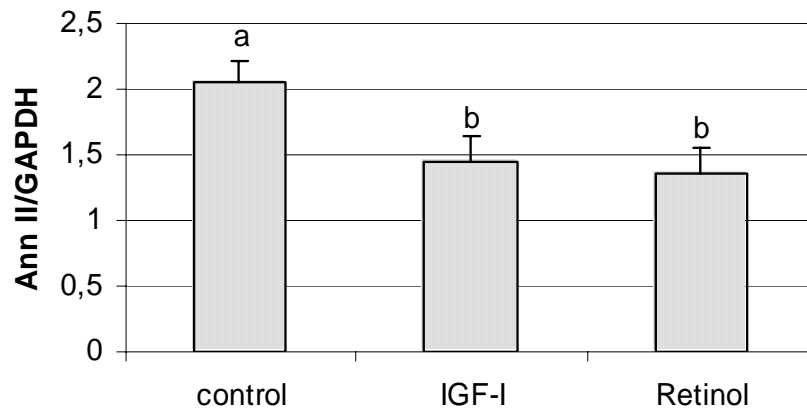


Figure 3. Semiquantitative expression of Ann-II in bovine embryos. The embryos were cultured on SOF medium (control) or SOF supplemented with 10 ng IGF-I/ml medium or 0.1 ng retinol/ml medium. The data are reported as the mean and standard error of the mean of the Ann-II/GAPDH ratio. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$).

DISCUSSÃO

A produção de embriões na última década apresentou grandes avanços relativos ao aprimoramento de técnicas que possibilitaram o domínio da manipulação e produção totalmente *in vitro* de embriões bovinos. As variações observadas nos resultados quantitativos e qualitativos, no entanto, fazem dessa biotecnologia alvo de várias pesquisas no sentido de entender melhor os eventos relativos ao controle da divisão celular, seja na maturação nuclear de oócitos como no desenvolvimento embrionário. Nesse trabalho foram pesquisados alguns aspectos relativos a expressão da proteína ANEII durante a foliculogênese e também no desenvolvimento embrionário, além da regulação dessa expressão por fatores como o IGF-I e o retinol.

A expressão do gene ANEII em folículos pré-antrais em bovinos foi observada em folículos secundários, mas não detectada em folículos primordial e primário. Em nosso conhecimento, essa foi a primeira vez que foi relatada a presença dessa proteína em folículos pré-antrais na espécie bovina. Folículos pré-antrais produzem diversas substâncias durante as fases de crescimento como as proteínas para a formação da zona pelúcida (van Wezel & Rodgers, 1996). Ainda não se conhece os fatores envolvidos na ativação do folículo primordial. Provavelmente, a ANEII não esteja envolvida nesse processo, uma vez que não foi detectada a presença dessa proteína em fases iniciais de desenvolvimento folicular. O fato de ser insuficiente a quantidade de transcrito para ser detectada com a metodologia utilizada não deve ser descartado. A ANEII parece ter participação positiva nos

processos de competência e capacitação do oócito. Os oócitos permanecem na fase de prófase da primeira divisão meiótica até pouco antes da ovulação. Durante a fase de crescimento do oócito, há síntese de proteínas responsáveis por esse aumento de tamanho, que são também essenciais para a maturação, fecundação e desenvolvimento do embrião (Eppig et al., 1989). Com a finalização do crescimento, logo após a formação do antro folicular, os oócitos se tornam competentes para reiniciar a primeira divisão meiótica, porém não totalmente capacitados. Essa maior expressão de ANEII em oócitos de folículos >8mm, sugere uma participação da ANEII no processo de capacitação do oócito.

Esses dados reforçam a evidência de que a ANEII pode estar envolvida no processo de capacitação do oócito, pois oócitos de folículos acima de 6mm têm maior capacitação a chegar até o estágio de blastocisto que oócitos de folículos de menor tamanho.

O retinol utilizado no período de maturação promoveu um incremento na quantidade de RNAm para ANEII quando comparado ao controle. O retinol foi testado tendo em vista a sua capacidade de regulação da síntese protéica em vários tecidos de diferentes espécies. Em decorrência da expressão gênica ocorrer somente na primeira hora da maturação do oócito, e cessar até MII, esses resultados indicam que o retinol pode ter aumentado a transcrição no início da maturação ou diminuído a tradução e/ou degradação de RNAm para ANEII. Apesar do retinol não modificar a cinética da maturação do oócito, foi capaz de incrementar de forma significativa o percentual de clivagem em meio quimicamente definido (Bortolotto et al., 2001). É possível que o

retinol altere a expressão ou tradução gênica nessa fase de maturação, o que poderá influenciar na capacidade de fecundação e no desenvolvimento embrionário. O reinício e progressão da meiose é um processo dependente de oscilações intracelulares do íon cálcio (Kleine, 1996), os quais induzem a degradação do MPF, sendo que, uma única oscilação de cálcio é suficiente para induzir a dissolução da vesícula germinativa (Wu et al., 1992). A ANEII é uma proteína associada a atividade de canais de cálcio presente no oócito (Dreier et al, 1998), e pode ser um fator importante na competência e capacitação do oócito, no entanto o efeito real dessa proteína em tais eventos deve ser melhor estudado.

A expressão de ANEII em embriões bovinos foi demonstrada pela primeira vez nesse trabalho, as informações a esse respeito em animais de interesse comercial são muito escassas, apenas havia sido relatada a presença dessa proteína em embriões de anfíbios (Izant & Brysons, 1991) e de uma seqüência homologa a proteína que está associada a ANEII em peixes (Bobe & Goetz, 2000). Em anfíbios, essa proteína foi observada em todas as fases da oogênese e também durante o desenvolvimento embrionário, assim como os nossos resultados também apresentaram esse mesmo perfil, com exceção em embriões com 16 células, próximo ao bloqueio embrionário. Nós observamos que mesmo durante a fase de bloqueio (8 células) ainda há transcrição de ANEII de origem materna.

No presente trabalho nós observamos o efeito benéfico da suplementação de retinol ao meio de desenvolvimento embrionário. Esses dados corroboram com estudos anteriores onde a utilização de

retinol promoveu um incremento significativo na produção de blastocisto em meio KSOM sobre monocamada de células epiteliais do oviduto (Montagner,1999). Os nossos resultados foram obtidos com a utilização do meio SOF, sem células do oviduto e em uma atmosfera diferente, no entanto o efeito positivo do retinol foi verificado, mesmo com essas alterações no sistema de cultivo. O retinol possui atividade anti-oxidante, minimizando a peroxidação lipídica na membrana celular (Dobreanu & Mody, 1997), a qual é danosa às células embrionárias. Além disso, o retinol atua prevenindo a apoptose podendo alterar as cascatas de eventos desse processo (Koshimuzi et al. 1995). Outro dado importante se refere a estação do ano em que foi realizada o experimento, os índices de produção de blastocisto durante o período de clima ameno, em que o regime de chuvas é regular e a oferta de pastagens é maior, são superiores aos apresentados nesse trabalho, realizado entre os meses de abril e junho. É possível que os índices de produção de blastocistos do grupo controle tenham sofrido alguma influência do *status* nutricional dos animais doadores de oócitos, pois normalmente são mais elevados, no entanto a suplementação do meio com retinol minimizou esses efeitos. A utilização de retinol como forma de melhorar os índices de produção *in vitro* de embriões parece cada vez mais consolidada, esses estudos demonstram que o retinol é importante para o desenvolvimento embrionário, especialmente em épocas do ano em que a variabilidade nos resultados é muito grande.

Na avaliação semiquantitativa da expressão de ANEII em blastocistos produzidos em meio SOF (controle) ou suplementados

com 10ng/ml IGF-I de meio ou 0,1ng/ml de meio de retinol (grupo IGF-I e retinol, respectivamente), foi observado que a expressão de ANEII foi inibida quando retinol ou IGF-I estavam presentes. A ANEII está presente em todas as fases iniciais de desenvolvimento embrionário, no entanto os resultados positivos obtidos com a suplementação com retinol no meio de desenvolvimento, parecem ter relação com a expressão de ANEII no sentido de modular essa expressão. É possível que a ANEII desempenhe um papel negativo durante essa fase, visto que a produção de embriões aumenta qualitativamente (dados não mostrados) e quantitativamente quando o meio de desenvolvimento é suplementado com IGF-I ou retinol, respectivamente. O retinol, no entanto estimula a expressão de ANEII quando presente no meio de maturação de oócitos e pela análise semiquantitativa a quantidade de ANEII aumenta progressivamente em oócitos de folículos <3mm, 5-8mm e >8mm de diâmetro, indicando que esta proteína é importante na capacitação do oócito (Costa et al, prelo).

CONCLUSÕES

A ANEII tem uma maior expressão em oócitos capacitados. O retinol aumenta a disponibilidade de RNA mensageiro para ANEII, podendo estar envolvido na regulação da competência oocitária por diminuir a tradução ou evitar a degradação .

A produção de embriões *in vitro* é incrementada na presença de retinol que atua modulando a expressão de ANEII durante o desenvolvimento embrionário. A diminuição na expressão de ANEII na embriogênese de bovinos determina um aumento qualitativo e quantitativo na produção *in vitro* de embriões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMSTRONG, D.T., XIA. P., GANNES, G. et al. Differential effects of insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone on proliferation and differentiation of bovine cumulus cells and granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v.54, p.331-338, 1996.

BETTERIDGE, K. J., SMITH, C., STUBBINGS, R. B., XU, K. P., KING, W. A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**. v. 38, p. 87-98, 1989.

BOBE, J., GOETZ, F.W. A S100 homologue mRNA isolated by differential display PCR is down-regulated in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) postovulatory ovary. **Gene**, v. 257, p. 187-194, 2000.

BORTOLOTTO, E.B.; GONÇALVES, P.B.D.; NEVES, J.P.; COSTA, L.F.S., MACIEL, M.N.; MONTAGNER, M.M.; FARIAS A.M.; STRANIERI, P. Fator de crescimento derivado das plaquetas, retinol e insulina na regulação da maturação nuclear de oócitos bovinos e suas conseqüências no desenvolvimento embrionário. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.**, v.53, n.2, p.191-197, 2001.

BRAW-TAL, R., YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility** v. 109, p. 165-171, 1997.

BROWNSTEIN, C., DEORA, A.B., JACOVINA, A.T., WEINTRAUB, R. GERTLER, M., KHAN, K. M. F., FALCONE, D.J. and HAJJAR, K.A. Annexin II mediates plasminogen-dependent matrix invasion by human monocytes: enhanced expression by macrophages. **Blood**, v. 103, 317-324, 2004.

BROWNSTEIN, C., FALCONE, D.J., JACOVINA, A. and HAJJAR, K.A. Annexin II A Mediator of Cell Surface-Specific Plasmin Generation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 947, p. 143-156, 2001.

BUCCIONE, R., SHROEDER, A. C., EPPIG, J. J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 543-547, 1990.

BURGER, A., BERENDES, R., LIEMANN, S., BENZ, J., HOFMANN, A., GOTTIG, P., HUBER, R., GERKE, V., THIEL, C., ROMISCH, J., WEBER, K. Identification of binding domains in the sodium channel NaV1.8 intracellular N-terminal region and annexin II light chain p11 J. **Mol. Biol.** 257, 839–847, 1996.

CAIN, L., CHATTERJEE, S., COLLINS, T. J. In vitro folliculogenesis of rat preantral follicles. **Endocrinol.** v. 136, n.8, p. 3369-3377, 1995.

CARÁMBULA, S.F., GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R., NEVES, J.P., COSTA, L.F.S. Dissociação mecânica de ovários de fetos bovinos para isolamento de folículos pré-antrais. In: XI CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 1996. Canela, RS. **Anais...** Porto Alegre: Arq. Fac. Vet. UFRGS. 273 p.p. 235.

CAROLAN, C., LONERGAN, P., VAN LANGENDONCKT, A., MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology**, v. 43, p. 1115-1128, 1995.

COSTA, L.F.S. Desenvolvimento de folículos pré-antrais e imunohistoquímica de células ovarianas *in vitro* e *in situ* Santa Maria - RS. 68 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 1999.

CHUNG, C. Y. and ERICKSON H. P. Cell surface annexin II is a high affinity receptor for the alternatively spliced segment of tenascin-C. **J. Cell Biol.** v. 126, 539-548, 1994.

CRISWOLD, M.D.; BISHOP, P.D.; KIM, K.H.; REN, P.; SIITERI, K.E.; MORALES, C. Function of vitamin A in normal and synchronized seminiferous tubules. **Ann NY Acad. Sci.**, v. 564, p. 154-172, 1989.

CUI, J., MICHAILLE, J., JIANG, W. and ZILEA, M.H. Retinoid receptors and vitamin A deficiency: differential patterns of transcription during early avian development and the rapid induction of RARs by retinoic acid. **Developmental Biology**, v. 260, p. 496–511, 2003.

DEKEL, N., GALIANI, D., BEERS, W. Induction of maturation in follicle-enclosed oocytes: the response to gonadotropins at different stages of follicular development. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 517-521, 1988.

DONAHUE, R. Maturation of the mouse oocyte in vitro. Sequence and timing of nuclear progression. **Journal of Experimental Zoology**, v. 169, p. 237-250, 1968.

DREIER, R., SCHMID, K.W., GERKE, V., RIEHEMANN, K. Differential expression of annexins I, II and IV in human tissues: an immunohistochemical study. **Histochem Cell Biol**, v. 110, p. 137-148, 1998.

DUESTER, G., MIC, F.A., MOLOTKOV, A. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissuespecific metabolism to retinoic acid. **Chemico-Biological Interactions**, v. 143, p. 201-210, 2003.

EDWARDS, R.G. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. **Nature**, 208:349-351, 1965.

EPPIG, J.J. Growth and development of mammalian oocytes in vitro. **Arch. Pathol. Lab. Med.** v. 116, p. 379-382, 1992.

EPPIG, J.J., SHROEDER, A. C. Capacity of mouse from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 41, p.268-276, 1989.

ERICKSON, B.H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. **J. Reprod. Fert.**, v. 10, p. 97-105, 1966.

FAIR, T., HULSHOF, S.C.J., HYTTEL, P., GREVE, T., BOLAND, M. Oocyte Ultrastructure in Bovine Primordial to Early Tertiary Follicles. **Anatomy and Embryology**, v. 195, n. 4, p. 327-336, 1997.

FIGUEIREDO, J. R., HULSHOF, S.C.J., VAN DEN HURK, R., ECTORS, F.J., FONTES R.S., NUSGENS, B., BEVERS, M.M.,

BECKERS J.F. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 40, p. 789-799, 1993.

FISSORE, R.A. and VANDE WOUDE, G.F. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1261-1270, 1996.

FITZPATRICK, S. L., KASSAM, G., CHOI, K. S., KANG, H. M., FOGG, D. K., and WAISMAN, D. M. Regulation of Plasmin Activity by Annexin II Tetramer **Biochemistry** 39, 1021–1028, 2000.

FOLMAN, Y.; ASCARELLI, I.; HERZ, Z.; ROSENBERG, M.; DAVIDSON, M.; HALEVI, A. Fertility of dairy heifers given a commercial diet free of β -carotene. **Br. J. Nutr.**, v. 41, p. 353-359, 1979.

FUNSTON, R.N., SEIDEL Jr., G.E., KLINDT, J. et al. Insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor- binding proteins in bovine serum and follicular fluid before and after the preovulatory surge of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1390-1396, 1996.

GERKE, V. and MOSS, S.E., Annexins and membrane dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1357, p. 129–154, 1997.

GREENWALD, G.S., ROY, S.K. Follicular development and its control. In: Knobil, E., Neill, J. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1994. cap. 12, p. 629-724.

GREVE, T., MADISON, V., AVERY, B., CALLESEN, H. HYTTEL, P. In vitro production of bovine embryos: A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations. **Animal Reproduction Science**, v. 33, p. 51-69, 1993.

GUILLAND, J.C. and LEQUEU, B. As vitaminas: do nutriente ao medicamento. Santos Livraria, São Paulo, 357 p., 1995.

HARNEY, P.J.; OTT, I.T.; GEISERT, D.R.; BAZER, W.F. Retinol-Binding Protein Gene Expression in Cyclic and Pregnant Endometrium of Pigs, Sheep, and Cattle. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 1066-1073, 1993.

HASLER, J.F. Commercial production of in vitro-derived bovine embryos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 24, p. 117-134, 1996 (Supl.).

HULSHOF, S. C., FIGUEIREDO, J. R., BECKERS, J. F., BEVERS, M. M. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **The veterinary quarterly**. v. 16, n. 2, p. 78-80, 1994.

HERRLER, A., LUCAS-HAHN, A., NIEMANN, H. Effects of insulin-like growth factor-I on in-vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 37, p.1213–1224, 1992.

HYTTEL, P., GREVE, T., CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 38, p. 35-47, 1989.

IRELAND, J.J. Control of follicular growth and development. **J. Reprod. Fert.** v. 34, p. 39-54, 1987.

IZANT, J.G. AND BRYSONS, L.J. Xenopus Annexin II (Calpactin I) Heavy Chain Has a Distinct Amino Terminus. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 18560-18566, 1991.

JETTEN, A.M. Retinoids specifically enhance the number of epidermal growth factor receptors. **Nature**, v. 284, p. 626-629, 1980.

JOHNSON, J., CANNING, J., KANEKO, T., TILLY, J.L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**, v. 428, p.145-150, 2004.

JOST, M. and GERKE, V. Mapping of a regulatory important site for protein kinase C phosphorylation in the N-terminal domain of annexin II. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1313, 283-289, 1996.

KAISER, M.E., MERRILL, R.A., STEIN, A.C., BREBURDA, E. and CLAGETT-DAMEA, M. Vitamin A deficiency in the late gastrula stage rat embryo results in a one to two vertebral anteriorization that extends throughout the axial skeleton. **Developmental Biology** v. 257, p. 14–29, 2003.

KLINE, D. Activation of the mouse egg. **Theriogenology**, v. 45, p. 81-90, 1996.

KOSHIMIZU, U.; WATANABE, M.; NAKATSUJI, N. Retinoic acid is a potent growth activator of mouse primordial germ cells in vitro. **Develop. Biol.**, v. 168, p. 683-685, 1995.

KRISTOFFERSEN, E. K., and MATRE, R. Surface annexin II on placental membranes of the fetomaternal interface. **Am. J. Reprod. Immunol.** V. 36, p. 141-149, 1996.

LOHKA, M.J., HAYES, M.K., MALLER, J.L. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 85, p. 3009-3013, 1988.

LIU, H.K.; DORÉ, E.J.J.; ROBERTS, P.M.; KRISHNAN, R.; HOPKINS, M.F.; GODKIN, D.J. Expression and Cellular Localization of Retinol-Binding Protein Messenger Ribonucleic Acid in Bovine Blastocysts and Extraembryonic Membranes. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 393-400, 1993.

LIU, K.H.; GAO, K.; BAUMBACH, G.A.; GODKIN, J.D.
Purification and Immunolocalization of Ovine Placental Retinol-
Binding Protein. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 23-29, 1992.

LIU, Z., FOOTE, R.H. Development of IVM/IVF bovine embryos in
KSOM, TCM-199 and MENEZO B₂ with and without taurine.
Biology of Reproduction, v. 50, n. 1 (Suppl.), 1994.

LIU, J-L. and LEROITH, D. Insulin-like growth factor I is essential
for postnatal body growth in response to growth hormone.
Endocrinology, v. 140, p. 5178–5184, 1999.

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

LOTTHAMMER, K.H. Importance of B-Carotene for the Fertility of
Dairy Cattle. **Feedstuffs**. october 22, 1979.

MacKENZIE, H.S.; ROBERTS, P.M.; DORE, E.J.J.; Jr. and
GODKIN, J.D. Estradiol and Progesterone Regulation of Retinol-
Binding Protein (RBP) secretion and mRNA expression in bovine
endometrial tissue. In: 29TH ANNUAL MEETING OF SOCIETY
FOR THE STUDY OF REPRODUCTION. Ontario, Canada: The

University of Western Ontario. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 1, p. 79, 1996.

MATSUI, M., TAKAHASHI, Y., HISHINUMA, M., KANAGAWA, H. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulate the development of bovine embryos fertilized *in vitro*. **J. Vet. Med. Sci.**, v.57, p.1109, 1995.

MERMILLOD, P., LONERGAN, P., CAROLAN, C., KHATIR, H., POULIN, N., COGNIE, Y. In Vitro Maturation of Oocytes from Domestic Ruminants. **Contraception Fertilite Sexualite**, v. 24, n. 7-8, p. 552-558, 1996.

MILOVANOV, C., SIRARD, M.A. Manipulation of chromosome condensation by protein synthesis inhibitors and cyclic AMP during maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 41, n. 4, p. 819-827, 1994.

MONDADORI, R.G.; GONÇALVES, P.B.D., NEVES, J.P., COSTA, L.F.S., MONTAGNER, M.M.; CARÁMBULA, S.F., BORTOLOTTI, E.B. Fecundação e clivagem após a ativação da proteína quinase C durante a maturação de oócitos bovinos. **Ciência Rural**, v.29, n.1, p. 105-110, 1999.

MONTAGNER, M.M. Produção *in vitro* de embriões bovinos com meios congelados, hepes e retinol. Santa Maria - RS. 68 p. Dissertação

(Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 1999.

MOREIRA, F., PAULA-LOPES, F.F., HANSEN, P.J, BADINGA, L., THATCHER, W.W. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 57, p. 895-907, 2002.

MORGAN, O.R. AND FERNANDEZ, M.P. Distinct annexin subfamilies in plants and protists diverged prior to animal annexins and from a common ancestor. **J. Mol. Evol.** V. 44, P. 178-188, 1997.

MOTLÍK, J. Cytoplasmic aspects of oocyte growth and maturation in mammals. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 38, p. 17-25, 1989.

MOTLÍK, J., KUBELKA, M. Cell cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 27, p. 366-375, 1990.

OLSON, J.A. Provitamin A Function of Carotenoids: The Conversion of β -carotene into Vitamin A. **J. Nutr.**, v. 119, p. 105-108, 1989.

PALMA, G., A, MÜLLER, M., BREM, G. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.**, v.110, p.347-353, 1997.

PARRISH, J.J., KIM, C.L., BAE, I.H. Current concepts of cell-cycle regulation and its relationship to oocyte maturation, fertilization and embryo development. **Theriogenology**, v. 38, p. 277-296, 1992.

PAVLOK, A., LUCAS-HAHN, A. and NIEMAN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 31, p. 63–67, 1992.

PRELLE, K., STOJKOVIC, M., BOXHAMMER, K., et al. Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) and Long R³IGF-I Differently Affect Development and Messenger Ribonucleic Acid Abundance for IGF-Binding Proteins and Type I IGF Receptors in *in Vitro* Produced Bovine Embryos. **Endocrinology**, v. 142, p. 1309-1316, 2001.

ROTHHUT, B. Cell Mol. Participation of annexins in protein phosphorylation. **Life Sci.** v. 53, 522–526, 1997.

RAYNAL, P. AND POLLARD, H.B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.** v. 1197, p. 63 -93, 1994.

ROSS, A.C. Overview of Retinoid Metabolism In: SYMPOSIUM: RETINOIDS: CELLULAR METABOLISM AND ACTIVATION. **The J. of Nutrition**, v. 123, p. 346-350, 1993.

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Biblhca anat.** v. 24, p. 77-92, 1983.

SCHWARTZ, Z., SYLVIA, V.L., LARSSON, D., NEMERE, I., CASASOLA, D., DEAN, D.D. and BOYAN, B.D. 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ Regulates Chondrocyte Matrix Vesicle Protein Kinase C (PKC) Directly via G-protein-dependent Mechanisms and Indirectly via Incorporation of PKC during Matrix Vesicle Biogenesis. **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 277,p. 11828–11837, 2002.

SCHWEIGERT, F.J. & ZUCKER, H. Concentrations of vitamin A, β -carotene and vitamin E in individual bovine follicles of different quality. **J. Reprod. Fert.**, v. 82, p. 575-579, 1988.

SHAW, W.D.; FARIN, P.W.; WASHBURN, S.P.; BRITT, H.J. Effect of Retinol Palmitate on Ovulation Rate and Embryo Quality in Superovulated Cattle. **Theriogenology**, v. 44, p. 51-58, 1995.

SIMMEN, R. C. and SIMMEN, F.A. Insulin-like growth factors and blastocyst development. **Theriogenology**, v. 39, p. 163-175, 1993.

SINGH, B., and ARMSTRONG, D.T. Insulin-like growth factor-I, a component of serum that enables porcine cumulus cells to expand in response to follicle-stimulating hormone *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.56, p.1370-1375, 1997.

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

SIRARD, M.A., FLORMAN, H.M., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., et al. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 1257-1263, 1989.

SIRARD, M.A., COENEN, K. The co-culture of cumulus enclosed bovine oocytes and hemisections of follicles: effect on meiotic resumption. **Theriogenology**, v. 40, p. 933-942, 1993.

STALLINGS-MANN, L.M.; TROUT, E.W.; ROBERTS, M.R. Porcine Uterine Retinol-Binding Proteins Are Identical Gene Products to the Serum Retinol-Binding Protein. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 998-1005, 1993.

SUN, F.Z. and MOOR, R.M. Nuclear-cytoplasmic interactions during ovine oocyte maturation. **Development**, v. 111, p. 171-180, 1991.

SUSS, U., WUTHRICH, K., STRANZINGER, G. Chromosome configurations and time sequence of first meiotic division in bovine oocytes matured *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.38, p.871-880,1988.

SWANN, K. and OZIL, J.P. Dynamics of the Calcium Signal that triggers mammalian egg activation. **International Review of Cytology**, v. 152, p. 183-222, 1994.

THIBAUT, C. Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p. 1-15, 1977.

THOMAS, P.G.A.; LESLIE, M.V.; HANSEN, P.J. Retinol binding protein is produced by the bovine endometrium and accumulates in uterine secretions in a progesterone-dependent manner. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 27, p. 55-66, 1992.

TRESSLER, R. J., UPDYKE, T. V., YEATMAN, T., and NICOLSON, G. L. Extracellular annexin II is associated with divalent cation-dependent tumor cell-endothelial cell adhesion of metastatic RAW117 large-cell lymphoma cells. **J. Cell. Biochem.** v. 53, p. 265–276, 1993.

TSAFRIRI, A., KRAICER, P. The time sequence of ovum maturation in the rat. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 29, p. 387-393, 1972.

VALLET, L.J.; KLEMCKE, G.H.; CHRISTENSON, K.R. Effect of the Conceptus and Lack of Effect of Uterine Space on Endometrial

Protein Secretion during Mid-Gestation in Swine. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 748-754, 1994.

VIGNOLA, A.G.H., PRADO, A.D., VALENTE, A., RUBIM, M.I.B., GONÇALVES, P.B.D. Técnicas de coloração cromossômica para estágios específicos da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Ciência Rural**, v. 24, n. 3, 1994.

WANG, Q.Z. and KIM, H.K. Retinol Differentially Regulates Male Germ Cell-Associated Kinase (mak) Messenger Ribonucleic Acid Expression during Spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 951-964, 1993.

WANG, X.N. AND GREENWALD, G.S. Human chorionic gonadotropin or human recombinant follicle-stimulating hormone (FSH)-induced ovulation and subsequent fertilization and early embryo development in hypophysectomized FSH-primed mice. **Endocrinology**, v. 132, p. 2009-2016, 1993.

WASSARMAN, P.M., ALBERTINI, D.F. Mammalian ovum. In: Knobil, E., Neill, J. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1994. cap. 3, p. 79-123.

van WEZEL, I., RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1003-1011, 1996.

WOLF, G. Multiple Functions of Vitamin A. *Physiological Reviews*, U.S.A., v. 64, p. 873-936, 1984.

WU, B., IGNOTZ, G., CURRIE, YANG X. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during *in vitro* maturation of bovine oocytes. ***Biology of Reproduction***, v. 56, p. 253-259, 1997.

YOSHIMURA, Y., ANDO, M., NAGAMATSU, S. et al. Effects of insulin-like growth factor-I on follicle growth, oocyte maturation, and ovarian steroidogenesis and plasminogen activator activity in the rabbit. ***Biology of Reproduction***, v.55, p.152-160, 1996

ZHAO, W., CHEN, G.H., CHEN, H., PASCALE, A., RAVINDRANATH,. QUON, L.M.J., and ALKON, D.L. Secretion of Annexin II via Activation of Insulin Receptor and Insulin-like Growth Factor Receptor. ***The Journal Of Biological Chemistry***, v. 278, 4205–4215, 2003.