

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DE BLOQUEADORES MEIÓTICOS NA
MATURAÇÃO E ULTRA-ESTRUTURA DE OÓCITOS E
SUA CONSEQÜÊNCIA NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES
IN VITRO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luciano Ricardo Sandri

Santa Maria, RS, Brasil

2007

EFEITO DE BLOQUEADORES MEIÓTICOS NA MATURAÇÃO E ULTRA-ESTRUTURA DE OÓCITOS E SUA CONSEQÜÊNCIA NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES IN VITRO

por

Luciano Ricardo Sandri

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

Orientador: Prof. João Francisco de Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil

2007

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO DE BLOQUEADORES MEIÓTICOS NA MATURAÇÃO E
ULTRA-ESTRUTURA DE OÓCITOS E SUA CONSEQÜÊNCIA NA
PRODUÇÃO DE EMBRIÕES IN VITRO**

elaborada por
Luciano Ricardo Sandri

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

João Francisco de Oliveira, Dr.
(Presidente/Orientador)

Alceu Mezzalira, Dr. (UDESC)

Marcelo Bertolini, Dr. (UDESC)

Santa Maria, 29 de junho de 2007.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Lori e Adélia, pelo incentivo e apoio que têm me dado durante todo esse tempo, pela educação e valores ensinados e por serem o espelho com o qual tive por base os princípios dignos de um bom cidadão.

Aos meus irmãos, Lori e Leandro, pela amizade entre nós e pelo estímulo positivo que sempre me deram.

Aos Profs. Paulo Bayard Dias Gonçalves e João Francisco de Oliveira, pela admiração que tenho por sua dedicação à Ciência, pelos conhecimentos transmitidos, confiança, amizade e ética.

Ao Rogério, pelos ensinamentos fundamentais para o desenvolvimento deste estudo, pela confiança, empatia e amizade durante esse tempo.

Aos colegas de laboratório, pela excelente convivência e amizade.

À grande Família, de professores e alunos, do Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (Biorep), por me dar a oportunidade de trabalho e crescimento pessoal.

Ao amigo Eduardo pela amizade e paciência de convívio de 3 anos em Santa Maria.

Ao colega de mestrado Bira que se tornou um grande amigo.

Aos amigos da academia Boa Forma.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante todo o período de realização do curso de mestrado.

À Universidade Federal de Santa Maria, pelo ensino público e gratuito, por proporcionar a formação superior a milhares de pessoas, aos professores que promovem a formação acadêmica e aos funcionários que dedicam seu trabalho em prol dos alunos e do curso.

À Deus, pela vida.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO DE BLOQUEADORES MEIÓTICOS NA MATURAÇÃO E ULTRA-ESTRUTURA DE OÓCITOS E SUA CONSEQÜÊNCIA NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES IN VITRO

AUTOR: LUCIANO RICARDO SANDRI

ORIENTADOR: JOÃO FRANCISCO OLIVEIRA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de junho de 2007.

O objetivo desse trabalho foi testar o efeito do Cordicepim (CY), um bloqueador da tradução do RNAm, na maturação citoplasmática do oócito bovino juntamente a um fator de crescimento (IGF-I), associado ou não ao Roscovitina (Ros), um bloqueador do fator promotor da mitose. Doze horas em cultivo com CY seguidos de 18 ou 24 horas de maturação foi suficiente para que 80% dos oócitos, em média, atingissem metáfase II. A produção de blastocisto após 12 horas de cultivo em meio com CY seguido de 18 horas (32,3%) de cultivo livre de inibição não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle (39,6%; $P > 0,05$). Um efeito negativo do Ros na produção de blastocistos foi observado quando não associado ao CY (16,7% e 49% de blastocistos, respectivamente). A diminuição na concentração de CY e Ros, quando associados, causou uma queda na produção de blastocisto (8,3% e 36,4% de blastocistos, respectivamente). Utilizando técnica de microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar que o cultivo por 12 horas em CY manteve o oócito com algumas características de imaturo, porém com acúmulo e atividades de algumas organelas característico de oócito maturo. Em conclusão, a exposição temporária de oócitos bovinos ao CY associado ao IGF-I, durante a maturação in vitro, permite um aumento no tempo de cultivo, sem afetar a ultra-estrutura citoplasmática do oócito e sem afetar os índices de desenvolvimento embrionário, associado ao Roscovitina ou não.

Palavras-chaves: Cordicepim, IGF-I, Roscovitina, oócito bovino.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção
Universidade Federal de Santa Maria

EFFECT OF MEIOTIC INHIBITION ON BOVINE OOCYTE MATURATION AND ULTRASTRUCTURAL CITOPASMATIC REORGANIZATION AND ITS CONSEQUENCE ON BOVINE EMBRYO PRODUCTION IN VITRO

AUTOR: LUCIANO RICARDO SANDRI

ORIENTADOR: JOÃO FRANCISCO OLIVEIRA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de junho de 2007.

The aim of this study was test the effect of Cordicepim (CY), an inhibitor of mRNA translation, associate with growth factor (IGF-I), in the presence or absence of Roscovitina (Ros), a mitogen promoting factor blocker. Twelve hours in culture media with CY plus 18 or 24 hours of maturation resulted in an average of 80% of oocytes reaching metaphase II. The blastocyst yield after 12 hours culture media with CY plus 18 hours of maturation without inhibition (32.3%) was similar ($P>0.05$) to the control group (39.6%). A negative effect of Ros on blastocyst yield was observed when not associated to CY, (16.7% in Ros vs 49% in control group). When the concentration of Ros associated with CY was reduced, the blastocyst yield was lower (8.3%) compared with the control group (36.4%). Transmission electron microscopy evaluation showed characteristics like a mature oocyte but also some characteristics of immature oocyte after 12 hours of inhibition. In conclusion, the temporary exposure of bovine oocytes to CY associated with IGF-I during in vitro maturation allowed an increase in culture time with no effect on cytoplasm ultra-structure and blastocyst yield, associated or not with Roscovitina.

Keywords: Cordicepim, IGF-I, Roscovitina, bovine oocyte.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Diferença entre as moléculas Adenosina e Cordicepim.	23
FIGURA 2 - Porcentagem de oócitos maduros após diferentes tempos de cultivo em meio suplementado ou não com Cordicepim	44
FIGURA 3 - Porcentagem de oócitos maduros, mantidos em meio com Cordicepim por 12 horas e posterior cultivo in vitro, em meio livre de inibidor por 18 ou 24 horas.....	45
FIGURA 4 - Porcentagem de Blastocistos nos diferentes tratamentos e grupo controle.....	46
FIGURA 5 - Corte representativo avaliado por microscopia eletrônica de transmissão de oócitos puncionados utilizando meio com e sem Cordicepim	47
FIGURA 6 - Microscopia eletrônica de transmissão de oócitos mantidos por 12 horas em meio com Cordicepim e IGF-I	48
FIGURA 7 - Microscopia eletrônica de transmissão de oócitos maturados por 12 horas em presença de Cordicepim seguido de 18 ou 24 horas de maturação em meio livre de inibidor.....	49
FIGURA 8 - Oócitos com retração de citoplasma ou íntegros.....	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Produção de blastocistos por PIV após diferentes tratamentos no meio de maturação. O tratamento Ros indica a presença de Roscovitina e IGF-I no meio, enquanto o tratamento Ros+CY indica a presença de Roscovitina e Cordicepim mais IGF-I. Grupo controle sem adição de inibidores e grupo DMSO para testar a toxicidade do DMSO... 51

TABELA 2 Efeito de diferentes concentrações de Ros e CY no meio de maturação sobre a produção de blastocisto. Os nomes dos tratamentos indicam o produto usado e os números a concentração. Ros indica a presença de Roscovitina, enquanto CY indica Cordicepim. As concentrações de cada produto vem logo após a sua sigla e esta em $\mu\text{M}/\text{ml}$ para o Ros e em $\mu\text{g}/\text{ml}$ para o CY..... 51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	09
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. Maturação nuclear de oócitos bovinos	12
2.2. Maturação citoplasmática de oócitos bovinos	16
2.3. Fatores de crescimento	20
2.4. Bloqueadores da meiose	22
3. CAPÍTULO 1 – Bloqueio meiótico in vitro com Cordicepim e Roscovitina na maturação e rearranjo ultra-estrutural do citoplasma de oócitos bovinos	24
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) já atinge hoje uma escala apreciável de utilização, sendo o Brasil um país de destaque nessa área. Atualmente o aperfeiçoamento dessa técnica tem se concentrado principalmente na otimização das condições de meios usados para a maturação de oócitos *in vitro*. Além do aprimoramento dos meios básicos usados, diferentes substâncias vêm sendo testadas para avaliar a sua ação no oócito e na produção de embriões *in vitro* (HERRLER, 1992; HUSSEIN, 2006; SIRARD, 1998). Resultados positivos foram obtidos, por exemplo, com a adição de IGF-I, com ação benéfica sobre o crescimento, diferenciação celular e efeito anti-apoptótico durante o desenvolvimento embrionário *in vitro* (DAUGHADAY & ROTWEIN, 1989; STEFANELLO, 2006). No entanto, a maioria dessas substâncias não apresenta nenhum efeito ou atuam negativamente sobre o oócito (ADONA & LEAL, 2004; DODE & ADONA, 2001; LONERGAN, 1997; LONERGAN, 2000). Esse fato se deve, provavelmente, a uma incompleta maturação citoplasmática do oócito, refletindo na capacidade do subsequente desenvolvimento embrionário (BLONDIN, 1997). *In vivo*, a capacitação do oócito começa após o seu crescimento máximo, quando atinge aproximadamente o tamanho de 130 μm . Nesse estágio, observa-se um crescimento e acúmulo de organelas citoplasmáticas, que irão se reorganizar após o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH; HYTTEL, 1997). Durante essa fase, ocorre a transcrição de pools de RNAm que serão usados pelo zigoto até o estágio de 8 células, momento em que ocorre a ativação do genoma embrionário (SIRARD, 2006).

A transcrição inicia com a ligação da polimerase II ao DNA em um sítio específico, abrindo a fita dupla. Para essa ligação são importantes enzimas como, poli-a polimerase (PAP) nuclear, cleavage polyadenylation stimulation factor (CPSF), cleavage stimulation factor (CstF) além da polimerase II. Essas enzimas se organizam em um complexo no início da transcrição

para a formação da poli-a, um conjunto de bases (especificamente adenosinas) conhecido como a cauda do RNAm (COLGAN & MANLEY, 1997; VASSALLI & STUTZ, 1995). Essa cauda tem o papel de estabilidade, ou seja, quando a mesma é aumentada pela PAP citoplasmática, o RNAm é traduzido (LEQUARRE, 2004). O Cordicepim (CY) é um análogo sintético da adenosina, com a falta de um grupamento hidroxila em sua estrutura (JAGGER, 1960). A falta desse grupamento o torna um bloqueador da tradução do RNAm, uma vez que o processo de alongação da cauda poli-a é interrompido por não haver uma conjugação entre o inibidor e a próxima base.

Alguns fatores importantes no reinício da meiose seguem esse padrão de tradução, dentre eles a Mos que regula a ação de algumas fosfatases como ERK1, ERK2 e MEK. Essas enzimas são responsáveis pelo controle da proteína quinase ativadora da fase mitótica (MAPK), que está relacionada com a manutenção do MPF, formação do fuso e manutenção da metáfase II (MII; HURK & ZHAO, 2005). Outro fator, a Ciclina B2, também segue o mesmo padrão, não sendo esse o único caminho de tradução para todos os fatores envolvidos no reinício da meiose. Essa ciclina é precursora do MPF (pré-MPF; BIN, 1997), importante para que o oócito que se encontra em vesícula germinativa (VG) progrida até MII e atinja a maturação nuclear. Além de sua ativação ocorrer síncrona com a quebra da VG (RVG), a sua forma ativa é responsável pela fosforilação de proteínas responsáveis pela formação do envoltório nuclear, condensação do material genético e organização citoesquelética (FISSORE, 1996). A Roscovitina (Ros) é um inibidor específico de ciclinas dependentes de quinases, o que o torna um eficiente bloqueador da retomada meiótica em oócitos bovinos, com 90% de eficiência (WOUDENBERG, 2006). Porém o seu uso isolado não teve efeito positivo na maturação oocitária (ADONA & LEAL, 2004).

Baseado nesse conhecimento é razoável supor que a utilização em conjunto de bloqueadores da meiose, tais como CY e Ros, durante a maturação *in vitro* do oócito bovino, favoreça a maturação citoplasmática e o consequente desenvolvimento embrionário. O objetivo

deste estudo foi avaliar o efeito do Cordicepim no bloqueio e reversibilidade meiótica, associado ao estímulo do IGF-I, no desenvolvimento embrionário e no rearranjo ultra-estrutural do citoplasma durante a maturação in vitro de ócitos bovinos, associado ou não ao Roscovitina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Maturação Nuclear de oócitos bovinos

O gameta feminino é uma célula diferenciada das demais, pois é a partir da sua união com o espermatozóide que ocorrerá o início de uma nova vida. Para poder desempenhar o seu papel, o oócito deve passar por uma longa fase de desenvolvimento, sincronizando a maturação nuclear e citoplasmática (PICTON et al., 1998). Essa maturação começa na fase fetal e pode levar meses ou anos para a sua conclusão (SIRARD, 2000). Durante esse tempo as principais ocorrências são a colonização do ovário, início e parada da meiose, aumento e maturação das organelas citoplasmáticas e transcrição e acúmulo de RNAm (SIRARD et al., 2006).

Em um determinado período de desenvolvimento embrionário, células germinativas primordiais migram do ectoderma embrionário, através de sinais hormonais, movimentos amebóides e quimiotaxia (produzidos pelas células somáticas durante o percurso) do saco germinativo à crista genital e, com alta atividade mitótica começam a sua colonização, chegando a 2.700.000 oogônias com 110 dias de gestação em bovinos (ERICKSON, 1966). Para que essa colonização ocorra, é necessário a expressão de fatores de adesão, compactação e crescimento. A diferenciação das células primordiais em oogônias acontece no momento em que elas perdem a sua motilidade, quando são circundadas pelas células somáticas oriundas do mesonefro e sofrem uma última duplicação do DNA. Essa transformação ocorre quando o cromossomo X está presente. Outra diferença é o citoplasma claro, devido a pouca quantidade de organelas e uma alta frequência de divisão mitótica (HURK et al., 2005). Na vaca, em torno dos 72-82 dias de gestação, algumas oogônias já iniciam a primeira prófase meiótica, passando então pelos estádios de leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno, onde ocorre a primeira parada da meiose, também

denominado estágio de dictióteno ou de vesícula germinativa (VG; RICHARDS, 1980). Durante essa fase, a oogônia é extremamente vulnerável devido à necessidade de grande quantidade de proteínas reparadoras de DNA e vários outros fatores de alinhamento e recombinação do material genético (MOTTA et al., 1997). Por isso existe uma grande baixa, aproximadamente 95%, no estoque de células no transcorrer desse processo. Durante a fase de diplóteno ou VG, ocorre a recombinação do material genético da fêmea com a do macho e já se tem um aumento das organelas presentes no citoplasma sendo essa a transição de oogonia para oócito (HURK et al., 2005).

Existem duas maneiras para que o oócito continue a meiose até se tornar uma célula haplóide: a primeira ocorre in vivo no folículo ovulatório após o pico de LH (hormônio luteinizante) e a segunda in vitro com a sua retirada de dentro do folículo. Em ambos ocorre o reinício da meiose, com a dissolução da membrana nuclear e condensação da cromatina no processo denominado de rompimento da vesícula germinativa (RVG), e a maturação nuclear passa pelos estádios de metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI), prófase II (PII) e progride até a metáfase II (MII), onde ocorre a segunda parada da meiose (GORDON, 1994). O tempo requerido para a maturação nuclear varia dependendo da espécie, no bovino, a RVG ocorre de 8-12 horas, a MI de 12-15 horas, a AI e a TI de 15-18 horas e a PII, MII de 18-22 horas após o pico de LH ou após a retirada do oócito do folículo (SIRARD et al., 1989; WU et al., 1997). A competência meiótica, ou seja, a habilidade do oócito para reiniciar a maturação nuclear é obtida no final da fase de desenvolvimento. Em bovinos, os oócitos atingem a completa competência meiótica com 110 µm em folículos com diâmetro de 2-3 mm (FAIR et al., 1995).

O armazenamento de determinados RNAs e proteínas é necessário para conferir a competência ao oócito (SIRARD & COENEN, 1994). Ao final desta fase, a atividade de transcrição é drasticamente diminuída e o oócito já é capaz de reiniciar a meiose e atingir a

metáfase II. Oócitos incompetentes são deficientes em RNAm para o fator promotor da fase M intracelular (MPF). Os oócitos reiniciam a primeira divisão meiótica depois do estímulo hormonal in vivo. Provavelmente, esse é um sinal comum para ativar o MPF e a MAP quinase (MAPK - “mitogen-activate protein”) para a maturação dos oócitos nos mamíferos (DEKEL, 1996).

O MPF é composto de dois componentes, a proteína p34cdc2 que controla a divisão celular (subunidade catalítica de 34 kD) e a proteína ciclina B1 (subunidade regulatória de 45 kD). A atividade do MPF durante a maturação do oócito é feita através da união entre a cdk1 e ciclina b2, o que forma o pré-MPF, que é ativado quando as subunidades, da unidade catalítica, treonina-14 e a tirosina-15 são desfosforiladas pela fosfatase da mesma família, a cdc 25 (KUMAGAI & DUNPHY, 1992; MALLER, 1994). O MPF ativo condensa a cromatina, quebra a vesícula germinativa e reorganiza o citoplasma para entrar na fase-M tanto da mitose quanto da meiose (WU et al., 1997). Os oócitos em fase de crescimento têm menores níveis de p34cdc2 e não podem progredir da fase G2 para M, porém, no fim da fase de crescimento há um grande aumento na concentração e na atividade da p34cdc2 para a aquisição da competência meiótica (CHESNEL & EPPIG, 1995; De VANTERY, 1996).

O MPF tem uma forte afinidade pela quinase da histona H1. Nos oócitos bovinos, essa quinase tem menor atividade no estágio de vesícula germinativa e tem um aumento gradual até atingir seu pico no estágio de MI. Depois desta fase, a atividade do MPF, medida através da histona H1, tem uma diminuição significativa que coincide com a AI e a TI. Um maior aumento da atividade do MPF é observado na MII, que é mantido por várias horas durante a maturação do oócito, diminuindo gradualmente depois de 30 horas da maturação do oócito (WU et al., 1997).

Em mamíferos, há evidências de que alguns eventos que ocorrem durante a maturação do oócito são regulados pela MAP quinase, também chamada de ERK (“extracellular regulated

kinase”). A família da MAP quinase é ativada em consequência da fosforilação de uma tirosina e uma treonina específicas durante a maturação do oócito. Uma vez ativa, ela será responsável pela fosforilação de várias proteínas citoplasmáticas e nucleares e pela manutenção do estágio de MII na segunda parada meiótica. A sua atividade é medida através da proteína básica da mielina, um substrato adicional da enzima. No bovino, a MAP quinase é ativada no estágio de RVG, e tem sua atividade máxima em MI e permanece com alta atividade até a formação dos pró-núcleos (NURSE, 1990; FISSORE et al., 1996). Esses achados sugerem que a MAP quinase pode estar envolvida no processo de fecundação. Um ativador natural da MAP é um produto da proto-oncogene *c-mos* (proteína *Mos*), uma serina/treonina quinase de 39 kD que atua na complexa cascata das quinases, onde imediatamente antes da MAP quinase, está a MAP quinase quinase precedida da MAP quinase quinase quinase. A *mos* também está envolvida na ativação do MPF, fosforilação dos microtubulos e é um componente indispensável do fator citostático, responsável pela manutenção da MII (FISSORE et al., 1996).

Há evidências que a maturação de oócitos é dependente de hormônios esteróides e de sinais químicos determinados por hormônios protéicos e fatores de crescimento. Esses sinais ativam receptores presentes na membrana citoplasmática, estimulando a formação intracelular de segundos mensageiros (BERRIDGE, 1985), como o diacilglicerol, o inositol trifosfato (IP3) e cálcio, os quais por ativação de quinases e fosfatases estão envolvidos na transmissão do sinal da membrana celular ao núcleo (BAE & CHANNING, 1985; KAUFMAN & HOMA, 1993).

O AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) tem uma função inibitória na maturação nuclear de oócitos de muitas espécies. No bovino, o AMPc induz uma inibição transitória do RVG, mas não impede a progressão até MI, evento esse correlacionado com a proteína quinase-A (PK-A), a qual é dependente de AMPc (HOMA, 1988; SIRARD, 1990). No entanto, substâncias que ativam a proteína quinase-C (PK-C) estimulam o reinício da meiose; enquanto que, as que

inibem esta proteína atrasam a maturação nuclear. Do mesmo modo que nas quinases, várias substâncias que atuam sobre as fosfatases podem inibir ou estimular o reinício da meiose (SIRARD et al., 2001).

2.2. Maturação Citoplasmática de oócitos bovinos

Para que o oócito tenha plena capacidade de desenvolver-se em embrião é necessário aumentar seu tamanho, acumular RNAm e energia, distribuir e aumentar suas organelas e sincronizar tudo isso ao reinício da meiose (HYTTEL et al., 1997). A maturação nuclear, taxas de fecundação e clivagem de oócitos maturados in vitro não diferem significativamente daqueles maturados in vivo. No entanto, a diferença na quantidade de embriões produzidos entre os dois é bem significativa, provavelmente devido à grande diferença existente entre a maturação citoplasmática entre os dois (LEIBFRIED et al., 1987; RIZOS et al., 2002).

Após cessada a fase de intensa mitose, o oócito perde qualquer comunicação intercelular existente e é aprisionado por células somáticas, futuras células da granulosa, formando o folículo primordial (HURK et al., 2005). Durante meses ou anos ele fica em forma de dormência ou quiescência, até receber sinais para iniciar o seu desenvolvimento, nesse momento o oócito possui em torno de 30 μm (PICTON et al., 1998). O núcleo do oócito é rodeado pelas mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e um pequeno complexo de Golgi, sendo possível a visualização dos nucléolos, os quais têm um importante papel na síntese de RNA. Quando duas ou mais camadas da granulosa se desenvolvem o folículo secundário é formado, nesse estágio o oócito entra em fase de crescimento extensivo. Uma grande organização citoplasmática ocorre através da produção de novos genes e organelas, assim como a redistribuição e modificação das existentes (VAN WEZEL & RODGERS, 1996). Durante o crescimento organelas como o complexo de Golgi começa a secretar grânulos corticais e proteínas da zona pelúcida. Diferente

da zp2 e zp3, a zp1 começa a ser transcrita no folículo primário e tem a função de ponte entre as outras duas. Já as duas primeiras têm funções de reação de acrossoma e bloqueio da polispermia (mamíferos; HYTTEL et al., 1997). Juntamente com um grande aumento na transcrição de RNAm e produção de proteínas, o número de ribossomos, mitocôndrias e outras organelas aumenta enormemente. Ocorre também um grande acúmulo de grânulos de glicogênio, gotas lipídicas e grânulos corticais. Muitas dessas organelas sofrem transformações e migram para a periferia do oócito durante os momentos finais da maturação (FAIR et al., 1996; SIRARD et al., 2006).

Quando os oócitos reiniciam a meiose durante a maturação, tanto *in vivo* como *in vitro*, a habilidade de produzir proteínas não é afetada, porém, ele perde a capacidade de transcrever (FOULADI NASHTA, 1998; BLONDIN & SIRARD, 1995), somente sendo restabelecida após a ativação do genoma embrionário, durante uma fase chamada de “transição materno-zigótica” (MZT), que no bovino ocorre no quarto ciclo celular entre os estádios de 8 a 16 células (BREVINI et al., 2002).

O oócito é responsável por conter as instruções necessárias para dirigir as primeiras divisões zigóticas e a ativação do genoma embrionário (BREVINI GANDOLFI & GANDOLFI, 2001). Antes da ativação do genoma do embrião, o desenvolvimento embrionário é suportado por RNAs e proteínas maternas, sintetizados durante a oogênese. No oócito, ao contrário do que ocorre com qualquer célula somática, o intervalo entre a síntese e a utilização do RNA e moléculas protéicas pode ser de até várias semanas, ocorrendo o armazenamento dessas moléculas em uma forma quiescente para o seu emprego no tempo certo ao longo da maturação do oócito e desenvolvimento embrionário inicial (PICTON et al., 1998). A eficiência de tal armazenamento, assim como a reativação oportuna das moléculas armazenadas determina a qualidade do oócito e a sua competência para o desenvolvimento embrionário.

O processo de armazenamento e reativação é feito pela poli(A), encontrada na região não traduzível final 3' de quase todo RNAm. A poli(A) é incorporada durante a transcrição nuclear, através de enzimas como a Cleavage/Polyadenylation Specificity Factor (CPSF), Cleavage Stimulation Factor (CstF) e Poli(A) polimerase (PAP). Ao se ligar em uma região específica para o início da transcrição, conhecida como promotor, a RNA polimerase II (pol-II) desenrola a fita dupla para começar a formar o RNA. Já no início desse processo, a CPSF, CstF e a PAP se ligam à poli-II, tendo como principal papel reconhecer a seqüência sinal para a montagem, o tamanho e a força da poli(A). A CPSF reconhece as seqüências, (AAUAAA upstream ao sitio de clivagem e à região rica em GU downstream), porém sozinha não tem uma ligação muito estável, tendo como auxílio para essa ligação a CstF, a qual aumenta essa força e faz uma ponte com a poli-II. A enzima responsável pela montagem da poli(A) é a PAP, sendo ajudada pelas outras duas (COLGAN & MANLEY, 1997; SEBASTIA & KELLER, 1999). Após a fase de alongação, a poli-II desliga-se da fita dupla e o RNA recém formado receberá os ajustes finais. No caso do RNAm a região final 3' precisa ser clivada e a poli(A) adicionada. O tamanho e força de ligação da poli(A) e o local preciso para o ataque das endonucleases é determinado pelas seqüências AAUAAA, a região rica em GU e a distância entre elas (JOHNSTON, 1995). Ao final do processo, o RNAm é levado ao citoplasma onde será armazenado até alongação da poli(A) e a conseqüente tradução. A enzima que reconhece o sinal para que ocorra um aumento na cauda poli(A) é a PAP. Essa se liga ao RNAm aumentando o comprimento da cauda sendo o sinal necessário para que ocorra a tradução (BRATU et al., 2003).

As modificações principais observadas durante a fase de desenvolvimento do oócito são

- a) as formações das junções intercomunicantes entre o oócito e suas células somáticas circundantes,
- b) desenvolvimento e deslocamento do complexo de Golgi para a periferia do oócito,
- c) desenvolvimento do retículo endoplasmático liso e das gotas lipídicas,
- d) formação dos

grânulos corticais e zona pelúcida, e) diferenciação da mitocôndria, f) quebra dos centríolos, g) transcrição e proteção dos RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) maternos para a síntese de proteína do oócito, das células somáticas e do desenvolvimento embrionário precoce (FAIR et al., 1996; HYTTEL et al., 1997).

Os fatores citoplasmáticos que originam durante o desenvolvimento e maturação dos oócitos são essenciais para a capacidade de desenvolvimento, aquisição da competência meiótica, fecundação e desenvolvimento embrionário. Os oócitos com uma maturação nuclear normal, em tempo regular, mas que possuem uma assincronia entre a maturação citoplasmática e a nuclear, não serão fecundados ou não irão ter um desenvolvimento embrionário (BLONDIN & SIRARD, 1995; BEVERS et al., 1997). Há uma significativa mudança na síntese protéica detectável após o pico de LH, que é observada simultaneamente com a reorganização das organelas citoplasmáticas durante a maturação do oócito (CRAN, 1989; MOTLIK & KUBELKA, 1990).

No decorrer do remodelamento do citoplasma, a maioria das organelas migra para o centro da célula. As mitocôndrias e o complexo de Golgi localizavam-se periféricamente no oócito imaturo, porém após a maturação as mitocôndrias estão distribuídas mais centralmente na superfície do ooplasma e o complexo de Golgi diminui o seu desenvolvimento simultaneamente com o agrupamento do retículo endoplasmático liso. Entretanto, os grânulos corticais associados com um segmento do retículo endoplasmático liso, permanecem próximo à periferia da célula. Há um aumento no número dos grânulos corticais depois do pico de LH (HYTTEL et al., 1989). O número de grânulos corticais no córtex é significativamente maior nos oócitos após o RVG que aqueles observados nos oócitos com a vesícula germinativa intacta.

A comunicação entre as células do cumulus e o oócito é através das junções intercomunicantes. As células somáticas processam um canal através da zona pelúcida para troca de substâncias com o citosol do oócito. Após o pico de LH, há uma evidente diminuição do fluxo

de substâncias das células da granulosa para o oócito e ocorrem mudanças morfológicas nessas junções (BEVERS et al., 1997).

2.3. Fatores de Crescimento

O desenvolvimento folicular e por conseqüente o do oócito nele contido, envolve complexas cascatas de ativação e inibição de enzimas, hormônios e fatores de crescimento. Apesar de não estar totalmente compreendido, sabe-se que os fatores de crescimento são indispensáveis para que ele ocorra, como o fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9), proteína morfogenética óssea 15 (BMP 15) e o fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) além de outros (RIEGER et al., 1998; HUSSEIN et al., 2006; HERRLER et al.; 1992; LONERGAN et al., 1996).

O IGF-I é um peptídeo de 70 aminoácidos, estruturalmente relacionado à insulina e conhecido por sua habilidade de promover crescimento e diferenciação celular. Embora tradicionalmente visto como um produto hepático, o IGF-I pode ser sintetizado em vários outros tecidos (DAUGHADAY & ROTWEIN, 1989). A ação do IGF-I é controlada pelas insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP's), ligando-se a esse fator. Sua família possui no mínimo seis componentes de diferentes pesos moleculares (IGFBP's 1-6). As de menor peso molecular parecem estar envolvidas na atresia folicular e capacitação oocitária, uma vez que além de atuar nas células foliculares o IGF também atua no complexo cumulus oócito (GINTHER et al., 2004). A expressão de seus receptores pode ser encontrada no oócito e embriões, já a expressão desse hormônio não ocorre no oócito (LONERGAN et al., 2000; YASEEN et al., 2001). A sua presença é importante durante a maturação do oócito *in vivo* uma vez que é encontrado em folículos pequenos (1-2 mm) até folículos em final de crescimento (GINTHER et al., 2002) .

Oócitos derivados de folículos pré-antrais de camundongos, cultivados na presença de IGF-I, atingiram um maior índice de blastocisto e um maior número de células em comparação àqueles embriões derivados de oócitos de folículos pré-antrais cultivados sem IGF-I (DEMEESTERE et al., 2004). Do mesmo modo, a adição de IGF-I ao meio de maturação aumenta o número de embriões que chegam ao estágio de blastocisto. Um efeito positivo do IGF-I no desenvolvimento embrionário foi encontrado somente quando o IGF-I foi usado em co-cultivo de células da granulosa (HERRLER et al., 1992) ou quando soro fetal bovino foi incluído no meio de cultivo (PALMA et al., 1997). Entretanto, um efeito positivo do IGF-I foi encontrado quando o meio de cultivo simples SOF foi utilizado ao invés do complexo TCM-199. MATSUI et al. (1997) obtiveram um aumento na porcentagem de mórulas de 34 para 40% após a adição de IGF-I ao meio SOF. Do mesmo modo, MOREIRA et al. (2002) e SIRISATHIEN et al. (2003) conseguiram uma maior taxa de blastocistos adicionando IGF-I a esse mesmo meio de cultivo embrionário. Esse aumento se deve a um maior número de células do trofoblasto, porém foi demonstrado um aumento no número de células do embrioblasto (SIRISATHIEN et al., 2003). O IGF-I possui um efeito anti-apoptótico o que explica o maior número celular no embrioblasto, uma vez que a taxa de apoptose nesse tipo celular é elevada. Em oócitos bovinos, a presença de IGF-I no meio de maturação suplementado com BSA (albumina sérica bovina) acelera a progressão da meiose pelo possível aumento nas atividades da histona H1 e da MAP quinase (MAPK) durante as fases iniciais da maturação nuclear (SAKAGUCHI et al., 2002), porém esse mesmo efeito não foi observado quando o soro fetal bovino (SFB) estava presente no meio de maturação (SAKAGUCHI et al., 2000). Estudos demonstram que o IGF-I é um fator importante durante o crescimento e maturação do oócito, o que explica uma maior qualidade e quantidade de embriões.

2.4. Bloqueadores da meiose

Inibidores do reinício da meiose têm sido utilizados com o intuito de aumentar o tempo de maturação citoplasmática *in vitro* e conseqüentemente melhorar a capacitação dos oócitos durante a MIV. Vários estudos vêm sendo realizados com diferentes grupos de bloqueadores tais como, os inibidores de fosfatases, da síntese protéica, da transcrição e tradução do RNAm. Os inibidores de fosfatases tais como Roscovitina e a butirolactona-I impedem a ativação da proteína p34cdc2 e da MAPK e dessa forma não permitem o reinício da meiose (KUBELKA et al., 2000; LONERGAN et al., 2000; MERMILLOD et al., 2000; PONDERATO et al., 2002), já a 6-dimetil-aminopurina (6-DMAP) inibe as proteínas kinases serina/treonina (SAEKI, et al., 1997). Esses produtos inibem de maneira efetiva o reinício da meiose, entretanto não melhoram o desenvolvimento embrionário *in vitro*. A ciclohexamida, um inibidor da peptidil transferase, impede a síntese de proteínas necessárias ao reinício da meiose e apesar de manter o oócito no estágio de VG não melhora a produção *in vitro* de blastocistos (LONERGAN et al., 1998; SAEKI et al., 1997). Inibidores da tradução e da transcrição do RNAm tais como, Cordicepim e o 5,6-dicloro-1- β -d-ribofuranosilbenzimidazole (DBR), respectivamente, param o início da cascata responsável pelo reinício da meiose (FARIN & YANG, 1994; KRISCHEK & MEINECKE, 2002).

O Cordicepim é um análogo sintético da adenosina, produto do metabolismo de fungos, mais precisamente da cepa *Codyceps militares*. O metabólito dessa cepa vem sendo usado em diversos ramos da pesquisa científica desde anti-fúngico a antibiótico, pois quando adicionado ao meio de cultivo celular ele inibe a tradução do RNAm (JAGGER et al., 1960; ALAN & RONALD, 1998). Essa inibição ocorre devido à falta do grupo 3'-OH na estrutura do Cordicepim, uma vez que a PAP reconhece o inibidor como uma adenosina e o integra ao final da

região 3' não traduzível. Isso impede que mais adenosinas se liguem a essa porção, evitando o alongamento da cauda poli-(A) o que impede a tradução do RNAm. O Cordicepim foi usado em alguns trabalhos com cultivo celular, porém a maioria com células somáticas. O trabalho feito em célula germinativa está voltado para o estudo das quinases envolvidas no reinício da meiose (KRISCHEK & MEINECKE, 2002).

Outro bloqueador do início da meiose utilizado é o Roscovitina, um inibidor específico de ciclinas dependentes de quinases. Ele compete pelo sitio de ligação de ATP na porção catalítica do MPF a p34cdc2 (MEIJER et al, 1997). Esse produto é amplamente usado em pesquisas que vão de inibidor da replicação viral a bloqueador do reinício da meiose. Vários trabalhos foram feitos com esse inibidor na PIV, alguns deles com intuito de melhorar a maturação citoplasmática do oócito através da inibição do reinício da meiose, dessa maneira aumentando a taxa de embriões produzidos, mas todos sem sucesso (BEVERIS et al., 2006; PONDERATO et al., 2001; MERMILLOD et al., 2000).

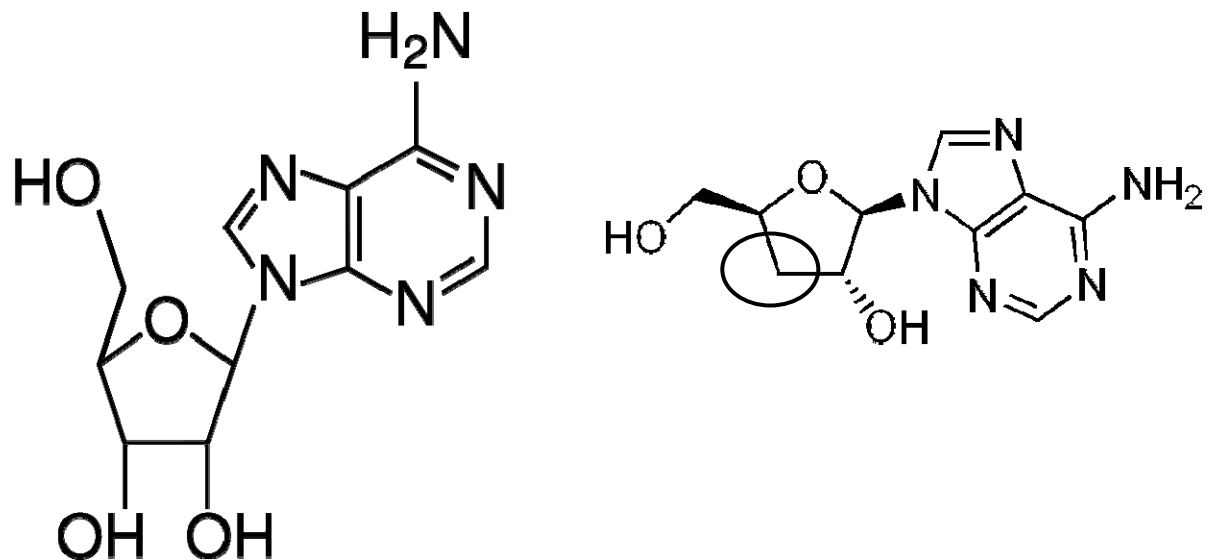


Figura 1 – Diferença entre as moléculas Adenosina (esquerda) e Cordicepim (direita) se deve somente pela falta de uma hidroxila, indica no círculo.

3. CAPÍTULO 1

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

**EFEITO DE BLOQUEADORES MEIÓTICOS NA MATURAÇÃO
E ULTRA-ESTRUTURA DE OÓCITOS E SUA CONSEQÜÊNCIA
NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES IN VITRO**

**Luciano Ricardo Sandri, Paulo Bayard Dias Gonçalves, Rogério Ferreira,
Marcos Henrique Barreta, Rodrigo Camponogara Bohrer, Emily Borges,
Caroline Madeira Lucci e João Francisco de Oliveira**

Molecular Reproduction and Development, 2007

EFEITO DE BLOQUEADORES MEIÓTICOS NA MATURAÇÃO E ULTRA-ESTRUTURA DE OÓCITOS E SUA CONSEQÜÊNCIA NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES IN VITRO

Luciano Ricardo Sandri¹, Paulo Bayard Dias Gonçalves², Rogério Ferreira¹, Marcos Henrique Barreta¹, Rodrigo Camponogara Bohrer³, Emily Borges⁴, Carolina Madeira Lucci⁵, João Francisco de Olivera⁶

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi testar o efeito do Cordicepim (CY), um bloqueador da tradução do RNAm, na maturação citoplasmática do oócito bovino juntamente a um fator de crescimento (IGF-I), associado ou não ao Roscovitina (Ros), um bloqueador do fator promotor da mitose. Doze horas em cultivo com CY seguidos de 18 ou 24 horas de maturação foi suficiente para que 80% dos oócitos, em média, atingissem metáfase II. A produção de blastocisto após 12 horas de cultivo em meio com CY seguido de 18 horas (32,3%) de cultivo livre de inibição não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle (39,6%; $P > 0,05$). Um efeito negativo do Ros na produção de blastocistos foi observado quando não associado ao CY (16,7% e 49% de blastocistos, respectivamente). A diminuição na concentração de CY e Ros, quando associados, causou uma queda na produção de blastocisto (8,3% e 36,4% de blastocistos, respectivamente). Utilizando técnica de microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar que o cultivo por 12 horas em CY manteve o oócito com algumas características de imaturo, porém com

¹ Médico Veterinário aluno do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

² Médico Veterinário, Doutor, Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM.

³ Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária da UFSM.

⁴ Médico Veterinário aluna do Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade de Brasília (UnB)

⁵ Médico Veterinário, Doutor, Professora Adjunta, Universidade de Brasília (UnB)

⁶ Médico Veterinário, Doutor, Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM, Hospital Veterinário, 97105-900, Santa Maria, RS. E-mail: joaofco@biorep.ufsm.br. Autor para correspondência.

acúmulo e atividades de algumas organelas característico de oócito maturo. Em conclusão, a exposição temporária de oócitos bovinos ao CY associado ao IGF-I, durante a maturação in vitro, permite um aumento no tempo de cultivo, sem afetar a ultra-estrutura citoplasmática do oócito e sem afetar os índices de desenvolvimento embrionário, associado ao Roscovitina ou não.

Palavras-chaves: Cordicepim, IGF-I, Roscovitina, oócito bovino.

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) já atinge hoje uma escala apreciável de utilização, sendo o Brasil um país de destaque nessa área. Atualmente o aperfeiçoamento dessa técnica tem se concentrado principalmente na otimização das condições de meios usados para a maturação de oócitos *in vitro*. Além do aprimoramento dos meios básicos usados, diferentes substâncias vêm sendo testadas para avaliar a sua ação no oócito e na produção de embriões *in vitro* (Herrler et al. 1992; Hussein et al. 2006; Sirard et al. 1998). Resultados positivos foram obtidos, por exemplo, com a adição de IGF-I, com ação benéfica sobre o crescimento, diferenciação celular e efeito anti-apoptótico durante o desenvolvimento embrionário *in vitro* (Daughaday and Rotwein 1989; Stefanello et al. 2006). No entanto, a maioria dessas substâncias não apresenta nenhum efeito ou atuam negativamente sobre o oócito (Adona and Leal 2004; Dode and Adona 2001; Lonergan et al. 2000; Lonergan et al. 1997). Esse fato se deve, provavelmente, a uma incompleta maturação citoplasmática do oócito, refletindo na capacidade do subsequente desenvolvimento embrionário (Blondin et al. 1997). *In vivo*, a capacitação do oócito começa após o seu crescimento máximo, quando atinge aproximadamente o tamanho de 130 μm . Nesse estágio, observa-se um crescimento e acúmulo de organelas citoplasmáticas, que irão se reorganizar após o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH; Hyttel et al. 1997). Durante essa fase, ocorre a transcrição de pools RNAm que serão usados pelo zigoto até o estágio de 8 células, momento em que ocorre a ativação do genoma embrionário (Sirard et al. 2006).

A transcrição inicia com a ligação da polimerase II ao DNA em um sítio específico, abrindo a fita dupla. Para essa ligação são importantes enzimas como, poli-a polimerase (PAP) nuclear, cleavage polyadenylation stimulation factor (CPSF), cleavage stimulation factor (CstF) além da polimerase II. Essas enzimas se organizam em um complexo no início da transcrição para a formação da poli-a, um conjunto de bases (especificamente adenosinas) conhecido como a

cauda do RNAm (Colgan and Manley 1997; Vassalli and Stutz 1995). Essa cauda tem o papel de estabilidade, ou seja, quando a mesma é aumentada pela PAP citoplasmática, o RNAm é traduzido (Lequarre et al. 2004). O Cordicepim (CY) é um análogo sintético da adenosina, com a falta de um grupamento hidroxila em sua estrutura (Jagger 1961). A falta desse grupamento o torna um bloqueador da tradução do RNAm, uma vez que o processo de alongação da cauda poli-a é interrompido por não haver uma conjugação entre o inibidor e a próxima base.

Alguns fatores importantes no reinício da meiose seguem esse padrão de tradução, dentre eles a Mos que regula a ação de algumas fosfatases como ERK1, ERK2 e MEK. Essas enzimas são responsáveis pelo controle da proteína quinase ativadora da fase mitótica (MAPK), que está relacionada com a manutenção do MPF, formação do fuso e manutenção da metáfase II (MII; Van Den Hurk and Zhao 2005). Outro fator, a Ciclina B2, também segue o mesmo padrão, não sendo esse o único caminho de tradução para todos os fatores envolvidos no reinício da meiose. Essa ciclina é precursora do MPF (pré-MPF; Wu et al. 1997), importante para que o oócito que se encontra em vesícula germinativa (VG) progrida até MII e atinja a maturação nuclear. Além de sua ativação ocorrer síncrona com a quebra da VG (RVG), a sua forma ativa é responsável pela fosforilação de proteínas responsáveis pela formação do envoltório nuclear, condensação do material genético e organização citoesquelética (Fissore et al. 1996). O Roscovitina (Ros) é um inibidor específico de ciclinas dependentes de quinases, o que o torna um eficiente bloqueador da retomada meiótica em oócitos bovinos, com 90% de eficiência (Beker-van Woudenberg et al. 2006). Porém o seu uso isolado não teve efeito positivo na maturação oocitária (Adona and Leal 2004).

Baseado nesse conhecimento é razoável supor que a utilização em conjunto de bloqueadores da meiose, tais como CY e Ros, durante a maturação *in vitro* do oócito bovino, favoreça a maturação citoplasmática e o consequente desenvolvimento embrionário. O objetivo

deste estudo foi avaliar o efeito do Cordicepim no bloqueio e reversibilidade meiótica, associado ao estímulo do IGF-I, no desenvolvimento embrionário e no rearranjo ultra-estrutural do citoplasma durante a maturação *in vitro* de ócitos bovinos, associado ou não ao Roscovitina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e maturação dos oócitos

Ovários bovinos em diferentes fases do ciclo estral foram obtidos em frigorífico e transportados ao laboratório em solução de NaCl a 0,9% contendo penicilina (100 UI/mL;) e estreptomicina (50 µg/mL; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) a uma temperatura de 30 °C. O intervalo máximo entre a coleta dos ovários e o início da punção dos folículos foi de quatro horas. No laboratório, os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram aspirados de folículos entre 3-8mm de diâmetro, em tubos contendo CY e/ou Ros com concentrações 10 vezes maior (diluídos em 1 ml de TCM-199) pois ao final da punção a quantidade de líquido folicular no interior dos tubos era de 10 ml. Ao final da punção as concentrações dos produtos eram as mesmas das placas de cultivo, os produtos eram adicionados aos tubos de punção conforme realização de cada experimento . Após sedimentação, os CCOs foram localizados usando um estereomicroscópio e selecionados conforme a classificação descrita por Leibfried and First (1979). Após a seleção os CCOs foram transferidos para uma placa contendo TCM 199 adicionado de CY na concentração de 79,6 nM/ml (20 ug/ml), IGF-I (10 ng/ml) e/ou Ros (25 µM/ml), os produtos eram usados conforme o delineamento de cada experimento e com exceção do quinto Experimento onde foram testadas diferentes concentrações, os demais Experimentos foram realizados conforme as concentrações descritas. As concentrações de IGF-I e Roscovitina usadas foram retiradas da literatura (Beker-van Woudenberg et al. 2006; Stefanello et al. 2006),

enquanto a do CY foi obtida através da realização de pré-experimentos realizados em nosso laboratório.

O meio de maturação utilizado foi o TCM 199 com sais de Earle e L-glutamina (Gibco), suplementado com 25 mM de Hepes (Sigma), 0.2 mM de ácido pirúvico (Sigma), 2.2 mg/ml de bicarbonato de sódio (Sigma), 100 UI/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina. Os oócitos foram cultivados em estufa com umidade e temperatura controladas em 5% de CO₂ a 39°C. Todos os experimentos usaram o mesmo meio de maturação básico, sendo adicionados componentes específicos de acordo com o delineamento de cada experimento.

2.2. Preparação espermática e fecundação in vitro (FIV)

Após a maturação, os oócitos foram transferidos para o meio de fecundação Fert-TALP contendo 10 µg/mL de heparina (Sigma), 100 UI/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina e PHE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina). A preparação espermática foi obtida de um mesmo pool de sêmen congelado, de partidas únicas e previamente testadas, proveniente de dois touros das raças Jersey e Holandesa. A separação espermática foi realizada através do gradiente de Percoll (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden), em duas concentrações diferentes, uma de 45% e outra de 90% para posterior centrifugação dos espermatozóides. Depois de separados e ajustada a concentração para 2×10^6 , os espermatozóides foram transferidos para a placa contendo os oócitos e mantidos em co-cultivo de 18 horas na mesma estufa usada para a maturação.

2.3. Cultivo Embrionário

Após a fecundação in vitro (18 horas), as estruturas foram transferidas para um micro tubo de centrifuga para separação das células do cumulus através do vortex. Na seqüência, foram lavados e transferidos para cultivo em 200 µL de meio SOF (fluido de oviduto sintético)

suplementado com 10% de SFB (Gibco), 105 µg/mL de glicina (Sigma), 35 µg/mL de L-alanina (Sigma), 146 µg/mL de L-glutamina (Sigma), 10 µL/mL de aminoácidos não essenciais 100x (Sigma) e 20 µL/mL de aminoácidos essenciais 50x (Sigma). As estruturas foram cultivadas em estufa a uma temperatura de 39°C e atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ em umidade saturada por nove dias.

2.2. Experimento 1

Para determinar o melhor tempo de permanência em meio de maturação com CY (20 µg/ml), os oócitos foram distribuídos em cinco tratamentos, a saber: tratamento 12CY, 12 horas no meio com CY; 24CY, 24 horas no meio com CY; 12CY+12M, 12 horas no meio com CY com transferência para uma nova gota com meio sem CY onde foi cultivado por mais 12 horas; 12CY+24M, 12 horas no meio com CY com transferência para uma nova gota com meio sem CY onde foi cultivado por mais 24 horas; 24CY+24M, semelhante ao 24CY, porém com permanência de mais 24 horas no meio de maturação sem CY e grupo controle, 24 horas no meio de maturação. Após o tempo de permanência no meio, os oócitos foram tratados com hialuronidase 10% (p/v) e as células do cumulus removidas através de vortex por 8 minutos. Na sequência, os oócitos foram fixados em ácido acético/metanol (1:3), por 12 horas e depois corados com LACMOID 60% (SIGMA L-7512). A maturação nuclear foi determinada por microscopia de contraste de fase.

2.3. Experimento 2

Baseado nos resultados do Experimento 1 e com o propósito de determinar o menor tempo de permanência nos meios de maturação sem CY, oócitos foram divididos em dois tratamentos e um grupo controle: Os oócitos foram cultivados por 12 horas no meio com CY e

mais 18 horas em meio sem CY; cultivo de 12 horas no CY mais 24 horas de maturação; e controle, 24 horas de maturação em meio sem CY.

2.4. Experimento 3

Para verificar o efeito do bloqueio da tradução do RNAm nos oócitos durante a maturação e a ação de um fator de crescimento, foi adicionado ao meio CY e IGF-I. Os oócitos foram mantidos por 12 horas em meio de maturação com CY e IGF-1, em seguida, transferidos para meio sem a presença dos dois fatores e maturados por 18 ou 24 horas. Um terceiro grupo, onde a maturação foi feita por apenas 24 horas, foi utilizado como controle. Após o cultivo foi realizada a fecundação e avaliado o desenvolvimento embrionário através da taxa de blastocisto obtida em cada tratamento e grupo controle.

2.5. Experimento 4

Para potencializar a inibição da retomada meiótica e testar o seu efeito na maturação citoplasmática do oócito bovino foi adicionado Ros (25 μ M/ml) ou Ros associado a 20 μ g/ml de CY ao meio com IGF-I (10 ng/ml). O Ros foi diluído em DMSO 1:500 na solução final. Os oócitos foram mantidos em meio com um dos inibidores por 12 horas e depois transferidos para meio de maturação sem inibidor por mais 18 horas. Em um terceiro tratamento foi adicionado apenas DMSO (25 μ M/ml; veículo usado para diluição do Roscovitina) com a finalidade de avaliar um possível efeito tóxico desse produto sobre o oócito. Adicionalmente um grupo controle foi submetido à maturação de 24 horas sem nenhum inibidor adicionado ao meio. Foram avaliadas as taxas de clivagem e blastocisto, porém as taxas de blastocistos foram obtidas tanto pela divisão de embriões por oócitos ou por clivados.

2.6. Experimento 5

Após analisados os dados do Experimento 4, foi delineado este experimento para verificar se a associação de CY e Ros potencializaria a ação no bloqueio meiótico e permitiria uma redução na concentração desses produtos para se obter uma maior viabilidade oocitária, um maior índice de blastocisto. Com o mesmo delineamento dos Experimentos 3 e 4, esse foi dividido em 4 tratamentos e um grupo controle. Os tratamentos foram divididos pelas diferenças entre as concentrações usadas de CY e Ros. Foi adicionado IGF-I em todos os tratamentos e ao grupo controle. As concentrações de CY e Ros foram as seguintes: Ros25/CY20 (25 μ M/ml de Ros e 20 μ g/ml de CY); Ros25/CY10 [25 μ M/ml de Ros e 39,8 nM/ml (10 μ g/ml) de CY]; Ros12,5/CY20 (12,5 μ M/ml de Ros e 20 μ g/ml de CY); Ros12,5/CY10 (12,5 μ M/ml de Ros e 10 μ g/ml de CY), sendo a concentração de CY 79,6 nM/ml quando usados 20 μ g/ml e 39,8 nM/ml quando usados 10 μ g/ml. A avaliação foi realizada conforme descrito no Experimento 4.

2.7. Experimento 6

Com a finalidade de avaliar a ação do CY na estrutura do oócito através da microscopia eletrônica de transmissão (MET), foi usado a mesma metodologia do Experimento 3, onde os oócitos foram cultivados com inibidor (CY) e IGF-I por 12 horas seguido de maturação livre de inibidores por 18 ou 24 horas. O grupo controle foi mantido por 24 horas em maturação no meio contendo IGF-I. No grupo controle, o cultivo foi interrompido às 0, 12, 18 e 24 horas. Para o grupo com 30 horas de cultivo, ou seja, 12 horas em inibição mais 18 horas de maturação foram escolhidos os tempos 0, 12, 30 e para o grupo com 36 horas os tempos 0, 12 e 36 horas. Os oócitos foram fixados em solução contendo 2% de paraformaldeído, 2,5% de glutaraldeído e 0,1 M de tampão cacodilato sódico (pH 7,2), por 3 horas em temperatura ambiente. Após a fixação, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato e pós-fixadas em 1% de tetraóxido de ósmio,

0,8% ferracidine potássico, 5 mM CaCl₂ em tampão cacodilato por 1 hora e, em seguida, lavados em 0,5% de acetato de uranil interrompendo a reação. Logo após, as amostras foram desidratadas em acetona para serem embebidas em resina epóxi. Cortes semifinos (3 µm) foram corados com azul de toluidina, observados e fotografados sobre microscópio de luz. Cortes finos (70 µm) foram contrastados com acetato de uranil e citrato de chumbo e analisados usando microscópio eletrônico de transmissão JEOL JIM 1011 (JEOL, Toquio, Japão). Para fotografia foi usado o software de microfotografia digital Gatan.

2.8. Análise Estatística

As variáveis dependentes foram comparadas, nos diferentes grupos, utilizando um modelo estatístico para dados categóricos (PROC CATMOD; SAS) e a comparação entre grupos foi realizada por meio de contrastes. As variáveis dependentes foram maturação nuclear (oócitos em A/T e MII), clivagem e produção de blastocistos. Os dados foram representados na forma de porcentagem e o nível de significância adotado foi de 5%.

3. RESULTADOS

3.1. Efeito do CY e IGF-I na maturação

No Experimento 1, os oócitos foram classificados de acordo com a fase meiótica como imaturos, Vesícula Germinativa (VG), Rompimento da Vesícula Germinativa (RVG) e Metáfase I (MI). Foram caracterizados como maturados os oócitos que atingiram Anáfase/Telófase (A/T) e Metáfase II (MII). Para os oócitos cultivados por 12 horas em meio de maturação contendo CY (tratamento 12CY), a taxa de VG foi de 36% enquanto a de RVG foi de 64%. O tratamento 24CY, após 24 horas de inibição apresentou 72,5% de imaturos com 49,5% de RVG e 23% de metáfase I (MI), restando 27,5% de maturados dos quais 4,5% de anáfase/telófase (A/T) e 23% de

metáfase II (MII). O 12CY+12M, com 24 horas de cultivo, teve 40% de imaturos, sendo 30% de RVG e 10% de MI, com 60% de maturação distribuída em 45% de A/T e 15% de MII. No 12CY+24M, após 36 horas de cultivo observou-se 10% em VG e 90% de oócitos maturados sendo 30% A/T e 60% MII, e. No grupo 24CY+24M, observou-se 61% de imaturos, sendo 17% de MI, 33% RVG e 11% VG e 39% de maturação divididos em 33% de MII e 6% em A/T e. No grupo controle, os percentuais para cada fase foram de 60% de MII, 36% de A/T totalizando 90% de maturação e 6% de imaturos em VG, RVG e MI. Quando comparado o percentual de maturação não houve diferença estatística entre: controle vs 12CY+24M; 24CY vs 24CY+24M; 12CY+12M vs 24CY+24M. Já os demais tratamentos apresentaram diferença entre si e com o grupo controle (Figura 2).

O segundo Experimento não apresentou diferença entre os tratamentos e o grupo controle. O tratamento 18 horas apresentou 77% de oócitos maturados (44% de MII, 33% de A/T) e 23% de imaturos (17% de RVG e 6% de MI); o tratamento 24 horas teve 64% de maturação (22% de MII e 44% de A/T) e 36% de imaturos (22% de RVG, 6% de VG e MI). O grupo controle atingiu 95% de maturados (58% de MII e 37% de A/T) e 5% de imaturos (5% RVG; figura 3).

3.2.Efeito do CY e IGF-I na produção de blastocistos.

No terceiro experimento foram usados dois tratamentos e um grupo controle. O tratamento 12CY+18M teve 32,3% de blastocisto contra 25,5% do grupo 12CY+24M e 39,6% do grupo controle. O grupo controle e o tratamento 12CY+24M apresentaram diferença estatística ($P < 0,05$) entre si, mas nenhum deles apresentou diferença com o tratamento 12CY+18M (Figura 4).

3.3.Efeito do CY, Ros e IGF-I na produção de blastocisto.

Divididos em três tratamentos e um grupo controle, o Experimento 4 está ilustrado na tabela 1. A porcentagem de oócitos clivados apresentou diferença entre; controle vs Ros+Cord e DMSO vs Ros e Ros+CY ($P < 0,05$). Quando a porcentagem de blastocisto foi calculada sobre o número de oócitos, as únicas diferenças apresentadas foram o tratamento Ros com os demais e o DMSO vs Ros+Cord ($P < 0,05$). Porém quando calculada sobre o número de clivados o tratamento Ros+CY não apresentou diferença estatística significativa ($P > 0,05$) somente com o grupo controle e este com o DMSO. Já o tratamento Ros apresentou diferença somente com o DMSO ($P > 0,05$).

No quinto Experimento, somente o grupo controle apresentou diferença estatística ($P < 0,05$) dos demais, quando calculada a porcentagem de oócitos clivados. Quando analisada a produção de blastocisto calculada sobre o número de oócitos, o grupo controle não se diferenciou somente do tratamento Ros25/CY20 e este apresentou diferença com o Ros12,5/CY10 ($P < 0,05$). Não houve diferença do tratamento Ros12,5/CY10 com os outros dois grupos. Porém se calculada sobre o número de oócitos clivados, o grupo controle foi estatisticamente diferente ($P < 0,05$) do tratamento Ros12,5/CY10, enquanto este último não apresentou diferença ($P < 0,05$) com o Ros12,5/CY20.

3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Todos os oócitos processados foram analisados inicialmente em microscopia de luz (corte semifino) e então submetidos ou não a MET. Somente os oócitos com citoplasma íntegro foram submetidos a MET. As características morfológicas dos oócitos foram avaliadas conforme descrito por Hyttel et al. (1997). Na hora zero, tanto o grupo tratamento quanto o controle não apresentaram alterações na estrutura dos oócitos. As células do cumulus apresentaram-se compactas, presença de vesícula germinativa (VG) e espaço perivitelínico pequeno. Mitocôndrias

de forma arredondada ou em forma de capuz, periféricamente no citoplasma, grânulos da cortical em grupos, na periferia do ovócito. Retículo endoplasmático rugoso (RER) geralmente associado a mitocôndrias e vesículas. Os oócito estavam imaturos com a presença de vesícula germinativa, com tamanho maiores do que $110 \mu\text{m}$ (Figura 5).

Na avaliação das 12 horas do tratamento os cortes semifinos não demonstraram nenhum oócito com retração de citoplasma (Figura 8). Na MET as células do cumulus ainda se apresentaram compactas com o espaço perivitelínico pequeno e grânulos da cortical em forma de cacho. Mitocôndrias periféricas, porém com algum pleomorfismo, RER abundante e de forma clássica. Já o grupo controle após 12 horas de maturação apresentava 12,5% de oócitos com retração de citoplasma e na MET pequenas diferenças em relação aos tratamentos, tais como, células do cumulus expandidas, espaço perivitelínico médio. Mitocôndrias em forma de capuz ou pleomórficas, homoganeamente distribuídas no citoplasma. Associação inicial de mitocôndrias, REL e vesículas, dando ao citoplasma uma organização com aspecto de teia/rede inicial. Característico de oócito com 12 horas de maturação (9-12 horas pós-pico LH; figura 6). As características apresentadas nas horas 18 e 24 do grupo controle foram semelhantes às de oócitos com 18 e 34 horas pós-pico pré-ovulatório e não houve retração na avaliação dos semifinos (Figura 8).

Com 30 horas de cultivo, 12,5% dos oócitos apresentaram retração (Figura 8) e na MET as células do cumulus ainda estavam compactas, sem a presença de VG com aumento no espaço perivitelínico. Mitocôndrias distribuídas de forma mais homogênea pelo citoplasma, grânulos da cortical alinhados à membrana citoplasmática. Associação de mitocôndrias, retículo endoplasmático liso (REL) e vesículas, dando ao citoplasma uma organização com aspecto de teia/rede. As características apresentadas nesse grupo se assemelhavam a de oócitos com 15 horas

de maturação pós-pico LH, porém as células do cumulus ainda se mantinham compactas (Figura 7).

Nos oócitos com 36 horas de cultivo, foram observados 40% de oócitos com retração de citoplasma (Figura 8) e na MET as células do cumulus estavam expandidas com a presença de corpúsculo polar. Associação de mitocôndrias, REL e vesículas, dando ao citoplasma uma organização com aspecto de teia/rede. Compatível com 24 horas pós-pico LH, semelhante ao observado nos oócitos do grupo controle com 24 horas de cultivo (Figura 7).

4. DISCUSSÃO

Quando foi usado um bloqueador da tradução do RNAm juntamente com IGF-I por 12 horas, com subsequente maturação por mais 18 horas livre desses agentes a produção de embriões, maturação *in vitro* e a ultra-estrutura do oócito bovino não foram afetadas mesmo havendo um aumento no tempo de cultivo (30 horas no total). Porém, quando aumentado o tempo de maturação em 24 horas, ocorreram mudanças no citoplasma, pois 40% dos oócitos desse tratamento sofreram retração citoplasmática. Outro fato relevante foi o efeito negativo da adição de Roscovitina juntamente com IGF-I, quando usado sem a presença do CY.

Durante o processo de tradução do RNAm citoplasmático, várias adenosinas são integradas a região final 3' não traduzível. Esse aumento de bases faz com que ocorra a tradução (Vassalli and Stutz 1995), porém a falta de um grupamento hidroxila na estrutura do CY impede que esse processo ocorra devido a descontinuidade no agrupamento das bases. Esse bloqueio agiu positivamente quando utilizado durante o período de 12 horas e foi o que manteve os oócitos em parada meiótica, com retomada de meiose e avanço até MII de quase 80% e produção de blastocisto semelhante ao grupo controle mesmo com um maior tempo de cultivo. A produção de proteínas é essencial nas oito primeiras horas de maturação para que ocorra a quebra da vesícula

germinativa (Lonergan et al. 1997), isso explica a parada meiótica por 12 horas demonstrada no Experimento 1. O motivo para a retomada da meiose após esse tempo se deve provavelmente ao padrão de tradução do RNAm, uma vez que o mecanismo da poli-A não é aplicado a todos. O envelhecimento ou o pouco tempo de maturação afetam negativamente a maturação *in vitro* (Park et al. 2005; Ward et al. 2002), isso explica os resultados obtidos nos outros grupos do Experimento 1.

O cultivo por mais 18 horas apresentou menos danos ao oócitos quando comparado com a de 24 horas. Dois fatos devem ser levados em conta neste resultado: um grande tempo em cultivo desorganiza estruturas nuclear e citoplasmática resultando em erros de pareamento dos cromossomos e queda na proporção de fecundação (Hunter 1997; Long et al. 1994). Outro fato relevante é que o uso de IGF-I durante esse período aumenta a transcrição (Sakaguchi et al. 2002) e, somando-se a isso à ação do CY no bloqueio da tradução, podem ter determinado grande aumento na quantidade de pré-enzimas responsáveis pelo reinício da meiose, acelerando o seu reinício e conclusão.

Outro fato positivo no uso do CY foi mostrado no Experimento 4, onde o seu uso em conjunto com IGF-I e Roscovitina mantiveram as produções de blastocisto na mesma proporção que o grupo controle. O detalhe está no uso isolado do Roscovitina atuando negativamente sobre o oócito. O uso isolado deste produto foi testado em outros estudos e os resultados foram controversos (Adona and Leal 2004; Mermillod et al. 2000), em nosso laboratório, o efeito foi negativo e somente revertido quando usado em conjunto com o CY. A opinião dos pesquisadores é controversa também, mas provavelmente danos no citoesqueleto e na reorganização na cromatina na retomada meiótica sejam os principais efeitos (Hunter 1997; Long et al. 1994). Um detalhe que chama atenção no bloqueio da tradução é uma diminuição nas taxas de clivagem, porém com manutenção dos índices de produção embrionária tendo uma tendência de ser maior

que o grupo controle se calculada as taxas de blastocistos sobre os oócitos clivados. Provavelmente esteja havendo uma melhora na maturação citoplasmática, pois apesar de haver uma baixa clivagem (50%), a produção de embriões desses clivados é alta (quase 70%) comparando-se com o grupo controle onde dos quase 90% clivados apenas 56,8% chegam a blastocisto. Esse fato levou a realização do quinto experimento, onde diferentes concentrações de bloqueadores foram usadas. Mesmo não obtendo nenhum resultado positivo o padrão do efeito dos bloqueadores se manteve, somente caindo quando usados em concentrações mais baixas diminuindo as suas ações levando a essa queda. As células do cumulus têm importante função durante a maturação do oócito (Sutton et al. 2003), as constantes trocas entre eles facilitam a maturação e preparação do gameta para a fecundação. A ação do CY pode afetar as células do cumulus, uma vez que elas não possuem a capacidade de acúmulo do oócito e todo o material transcrito é imediatamente usado. Essa não expansão pode ser um dos vários motivos para a baixa taxa de clivagem, pois in vivo o oócito é desnudo durante ou logo após a ovulação, significando uma interação mais rápida com a zona pelúcida. Outro fator importante para essa baixa clivagem é o tempo de cultivo, Ward (2002) obteve menores taxas de clivagem quando os oócitos eram submetidos a 32 horas de maturação, porém a produção de blastocistos foi a mesma do grupo com 16 horas de maturação, mas inferior ao grupo com 24 horas. Esse fato pode ser explicado pela desorganização dos grânulos corticais e do material genético. Em nosso estudo o tempo de 30 horas de cultivo não afetou a produção de blastocisto, mostrando mais um efeito positivo do CY associado ao IGF-I.

No último experimento, foi avaliado o efeito do CY na estrutura do oócito através de MET. O inibidor parece não afetar de maneira imediata, como mostram as fotos do grupo zero hora (Figura 5). Porém uma exposição maior parece ter um efeito positivo, pois o tratamento 12 horas mostrou a presença de RER (o que pode indicar uma maior produção de proteínas; figura

6), mudanças nas formas das mitocôndrias indicando um aumento na sua fosforilação oxidativa (Bereiter-Hahn and Voth 1994) e a não condensação do material genético, o que sugere a continuidade da transcrição. Essas observações evidenciam uma melhora em alguns aspectos da organização e maturação do citoplasma. Um fato relevante na avaliação desse grupo (12 horas em inibição) foram as características encontradas, sendo elas positivas como a presença de organelas de oócitos maduros, ou negativas como a não expansão das células do cumulus (Picton et al. 1998). Outro fato a salientar é que os oócitos mantidos em CY por 30 ou 36 horas em cultivo apresentaram características morfológicas de oócitos maturados apenas por 24 horas, esse resultado foi observado somente em oócitos que não apresentaram retração citoplasmática (Figura 7). Em conclusão o melhor tempo de cultivo em CY é o de 12 horas, com posterior cultivo sem CY por mais 18 horas. Essa exposição temporária de oócitos bovinos ao Cordicepim, bloqueador da tradução do RNAm, associado ao IGF-I, durante a maturação in vitro, permite um aumento no tempo de cultivo, sem afetar a ultra-estrutura citoplasmática do oócito e sem afetar os índices de desenvolvimento embrionário, associado ao Roscovitina ou não.

6. AGRADECIMENTOS

Ao Frigorífico Silva por ceder os ovários bovinos, matéria prima do estudo; a CAPES pela bolsa e ao PRONEX pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Adona PR, Leal CLV. 2004. Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. *Zygote* 12(3):197-204.
- Beker-van Woudenberg AR, Zeinstra EC, Roelen BAJ, Colenbrander B, Bevers MM. 2006. Developmental competence of bovine oocytes after specific inhibition of MPF kinase activity: Effect of estradiol supplementation and follicle size. *Animal Reproduction Science* 92(3-4):231-240.
- Bereiter-Hahn J, Voth M. 1994. Dynamics of mitochondria in living cells: Shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microscopy Research and Technique* 27(3):198-219.
- Blondin P, Coenen K, Guilbault LA, Sirard MA. 1997. In vitro production of bovine embryos: Developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology* 47(5):1061-1075.
- Colgan DF, Manley JL. 1997. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes and Development* 11(21):2755-2766.
- Daughaday WH, Rotwein P. 1989. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocrine Reviews* 10(1):68-91.
- Dode MAN, Adona PR. 2001. Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. *Animal Reproduction Science* 65(3-4):171-180.
- Fissore RA, He CL, Vande Woude GF. 1996. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biology of Reproduction* 55(6):1261-1270.
- Herrler A, Lucas-Hahn A, Niemann H. 1992. Effects of insulin-like growth factor-I on in-vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* 37(6):1213-1224.
- Hunter RHFG, T. 1997. Could artificial insemination of cattle be more fruitful? Penalties associated with aging eggs. *Reproduction in Domestic Animals* 32:137-141.
- Hussein TS, Thompson JG, Gilchrist RB. 2006. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Developmental Biology* 296(2):514-521.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47(1):23-32.
- Jagger DV. 1961. Inhibition of Ehrlich mouse ascites tumor growth by Cordicepim.
- Leibfried L, First NL. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Journal of animal science* 48(1):76-86.
- Lequarre AS, Traverso JM, Marchandise J, Donnay I. 2004. Poly(A) RNA is reduced by half during bovine oocyte maturation but increases when meiotic arrest is maintained with CDK inhibitors. *Biology of Reproduction* 71(2):425-431.
- Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Yang X, Boland M. 2000. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. *Molecular Reproduction and Development* 57(2):204-209.
- Lonergan P, Khatir H, Carolan C, Mermillod P. 1997. Bovine blastocyst production in vitro after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. *Journal of Reproduction and Fertility* 109(2):355-365.

- Long CR, Damiani P, Pinto-Correia C, MacLean RA, Duby RT, Robl JM. 1994. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured in vitro under various conditions of fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility* 102(2):361-369.
- Mermillod P, Tomanek M, Marchal R, Meijer L. 2000. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. *Molecular Reproduction and Development* 55(1):89-95.
- Park YS, Kim SS, Kim JM, Park HD, Byun MD. 2005. The effects of duration of in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. *Theriogenology* 64(1):123-134.
- Picton H, Briggs D, Gosden R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 145(1-2):27-37.
- Sakaguchi M, Dominko T, Yamauchi N, Leibfried-Rutledge ML, Nagai T, First NL. 2002. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. *Reproduction* 123(1):135-142.
- Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65(1):126-136.
- Sirard MA, Richard F, Mayes M. 1998. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: A review. *Theriogenology* 49(2):483-497.
- Stefanello JR, Barreta MH, Porciuncula PM, Arruda JN, Oliveira JF, Oliveira MA, Alves PB. 2006. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology* 66(9):2068-2076.
- Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. 2003. Effect of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction Update* 9(1):35-48.
- Van Den Hurk R, Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63(6):1717-1751.
- Vassalli JD, Stutz A. 1995. Awakening dormant mRNAs. *Current Biology* 5(5):476-479.
- Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M, Lonergan P. 2002. Optimization of in vitro bovine embryo production: Effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology* 57(8):2105-2117.
- Wu B, Iqnotz G, Currie WB, Yang X. 1997. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. *Biology of Reproduction* 56(1):253-259.

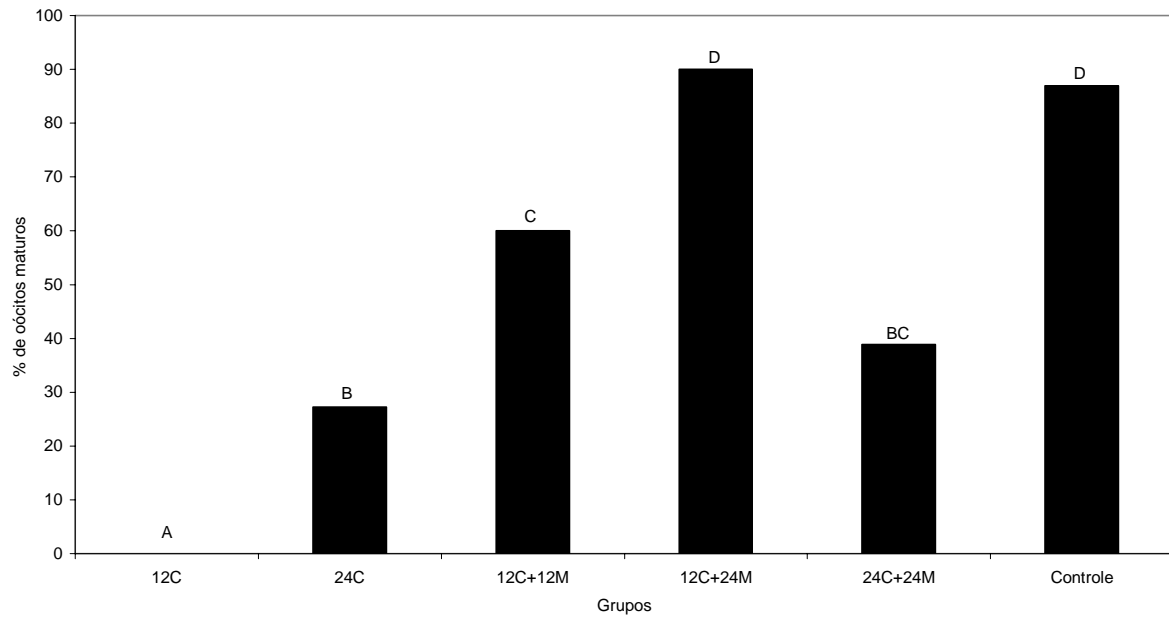


Figura 2 - Porcentagem de oócitos maduros após diferentes tempos de cultivo em meio suplementado ou não com Cordicepim. Os nomes (12C e 24C) indicam o tempo em inibição e 12M e 24M indicam o tempo de cultivo sem inibidor. Valores são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$) quando indicados com letras sobrescritas diferentes .

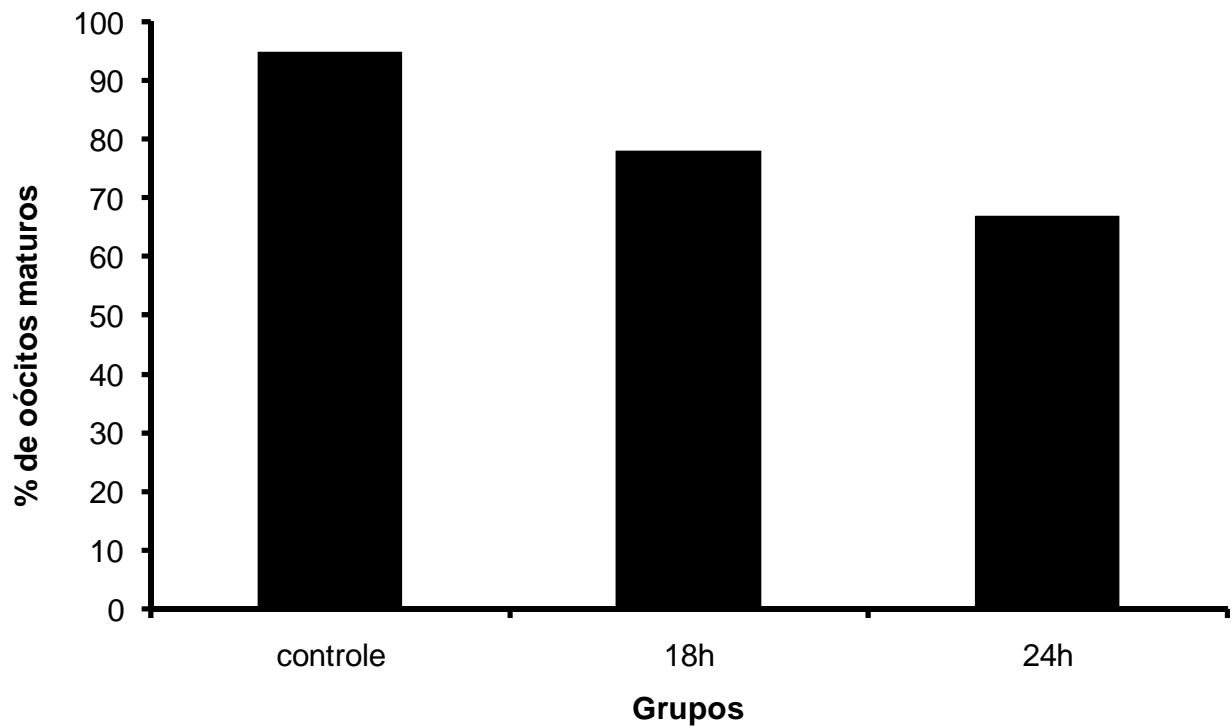


Figura 3 - Porcentagem de oócitos maduros, mantidos em meio com Cordicepim por 12 horas e posterior cultivo em meio livre de inibidor por 18 ou 24 horas. O grupo controle foi cultivado por 24 horas em meio sem Cordicepim. Não houve diferença estatística entre os grupos ($P>0,05$).

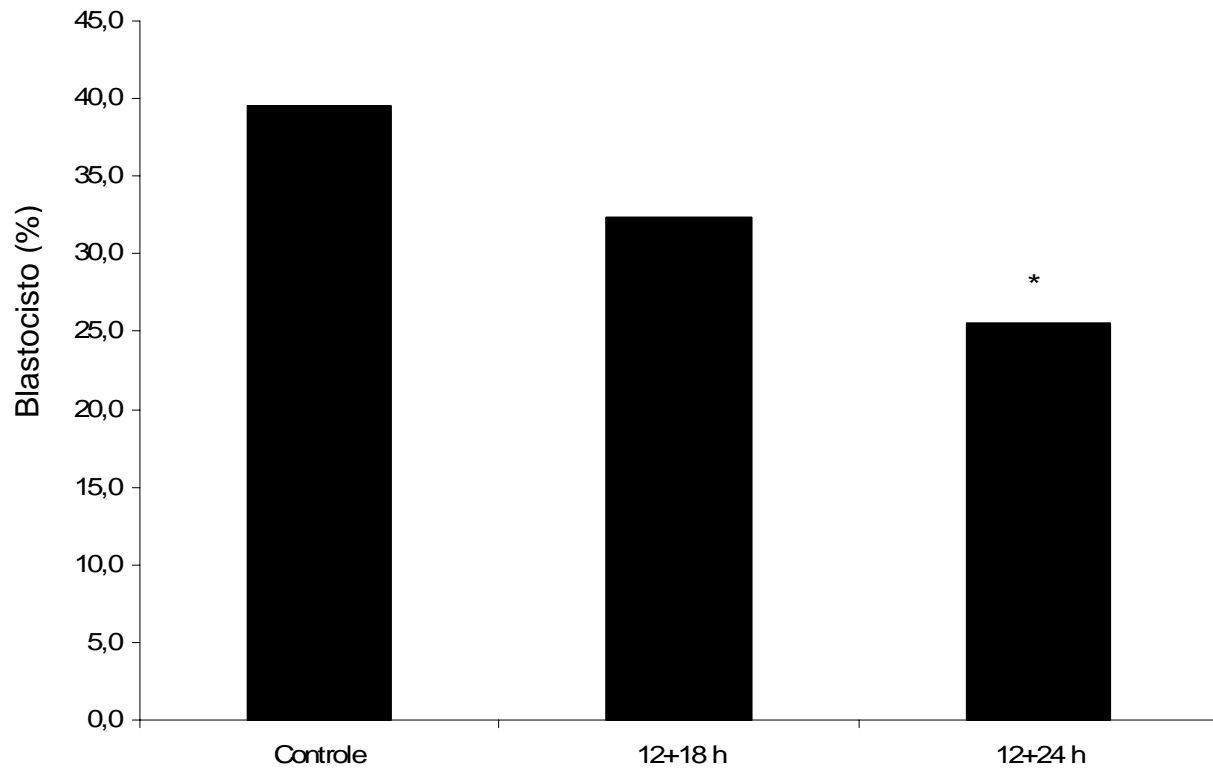


Figura 4 - Porcentagem de Blastocistos nos diferentes tratamentos e grupo controle (24 horas de maturação). Grupo 12+18h indica 12 horas de cultivo em inibição seguidos de 18 horas de cultivo livre de Cordicepim (CY); grupo 12+24h indica 12 horas de cultivo em inibição seguidos de 24 horas de cultivo sem CY. Valores são estatisticamente diferentes quando designados com um “*” ($p < 0,05$).

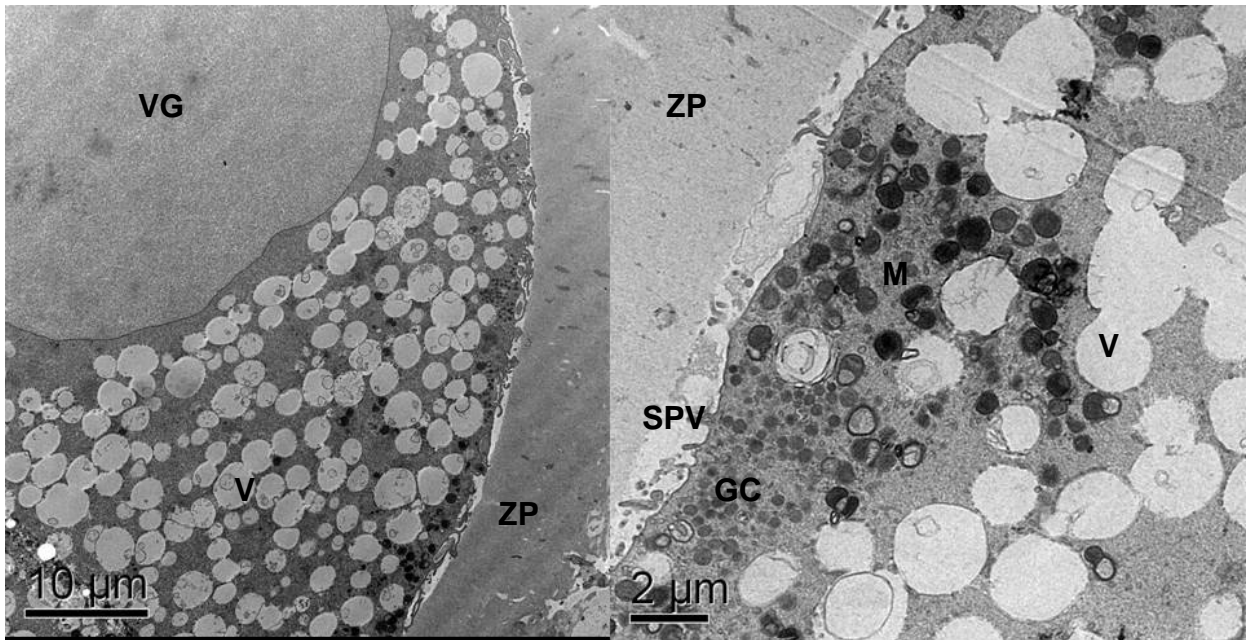


Figura 5 - Corte representativo avaliado por microscopia eletrônica de transmissão de oócitos puncionados utilizando meio com (esquerda) e sem (direita) Cordicepim (CY). Estruturas características de oócitos imaturos nas duas fotos, indicam ausência de toxicidade do CY. Zona Pelúcida (ZP); Vesícula Germinativa (VG), Mitocôndria (M); Vesículas (V); Grânulos corticais (GC); Espaço Perivitelínico (SPV).

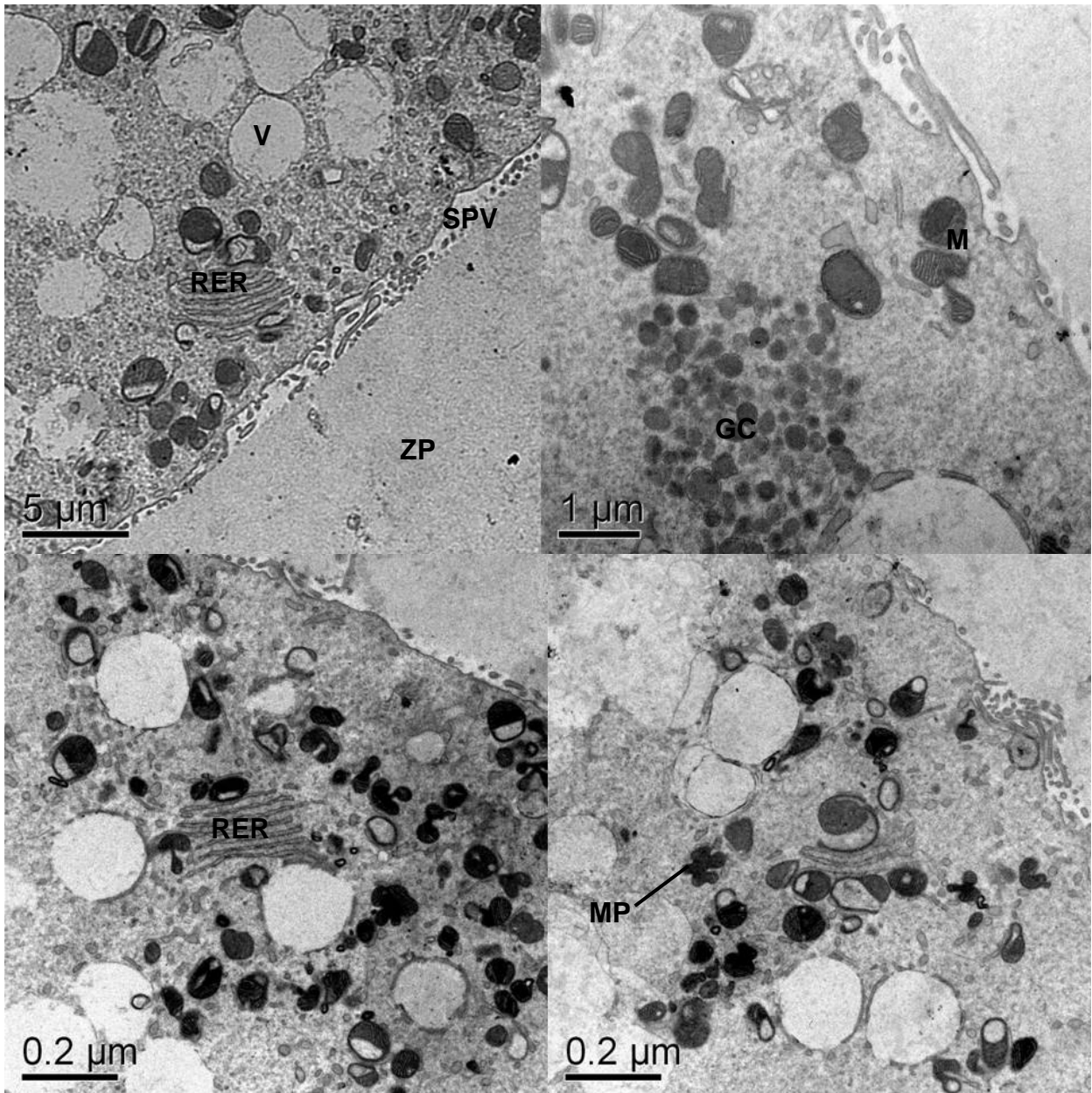


Figura 6 - Microscopia eletrônica de transmissão de oócitos mantidos por 12 horas em meio com Cordycepin e IGF-I. Presença de estruturas características de oócitos maduros como o retículo endoplasmático rugoso (RER) e mitocôndria polimorfa (MP). Presença também de características de oócitos imaturos como grânulos corticais em cachos e espaço perivitelínico reduzido. Zona Pelúcida (ZP), Grânulos Corticais (GC), Reticulo Endoplasmático Rugoso (RER), Espaço Perivitelinico (SPV), Vesícula (V), Mitocôndria (M), Mitocôndria Polimorfa (MP).

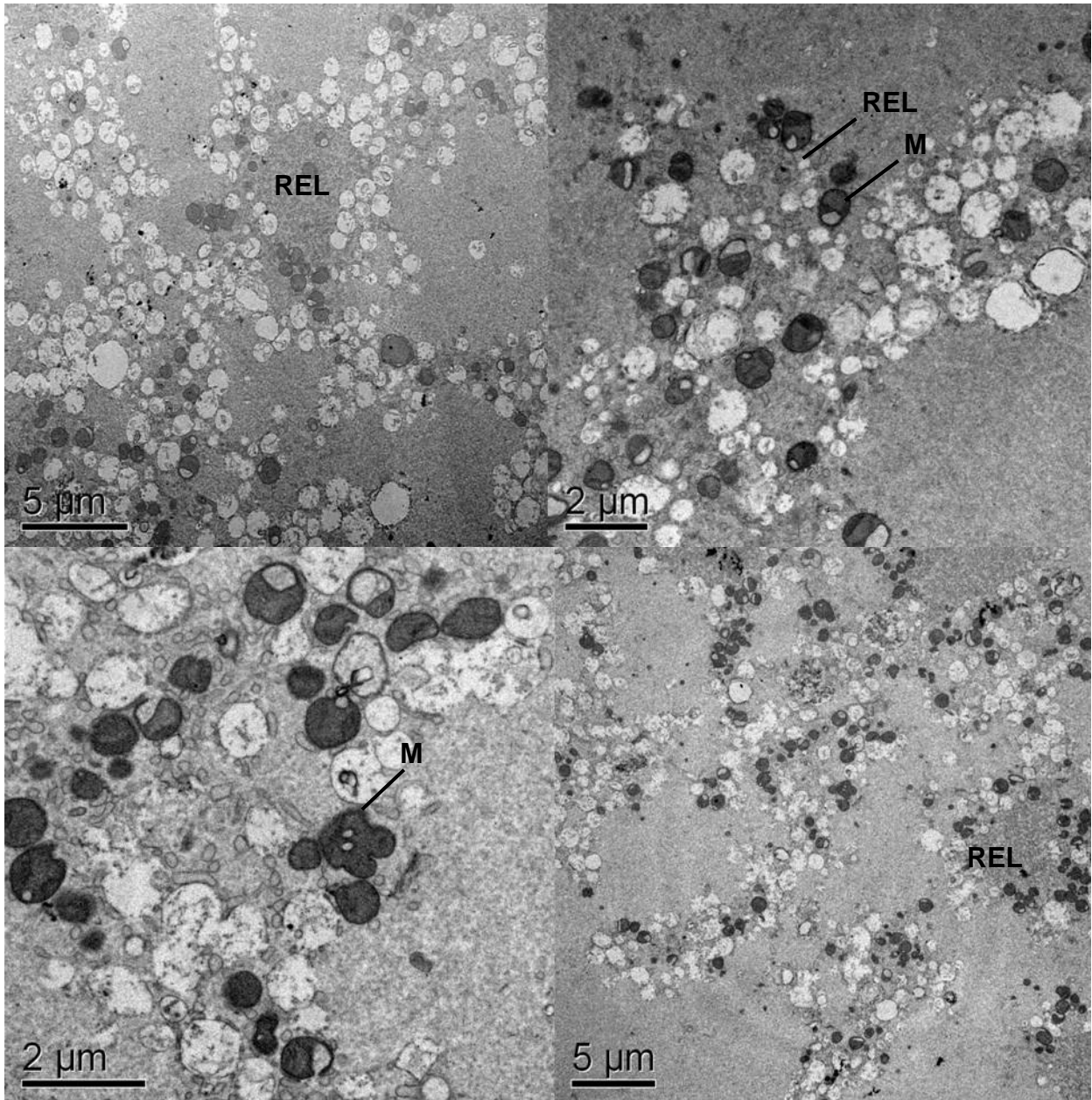


Figura 7 - Microscopia eletrônica de transmissão de oócitos maturados por 12 horas em presença de Cordicepim seguido de 18 ou 24 horas de maturação em meio livre de inibidor (painel superior) ou maturação por 24 horas sem inibidor no meio (painel inferior). Associações entre vesículas Mitocôndrias (M) e Reticulo Endoplasmático Liso (REL) em aspecto de teia ou malha.

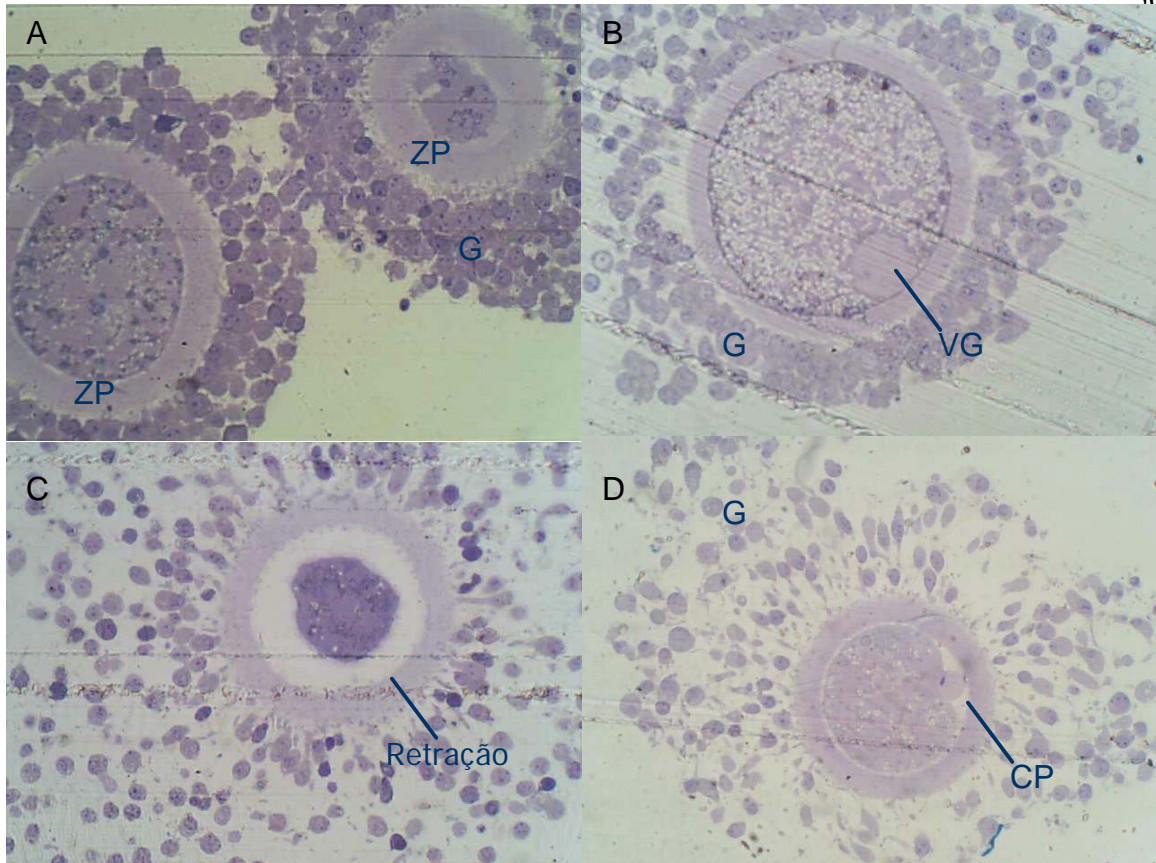


Figura 8 - A) Oócitos com retração de citoplasma (quadrante superior direito) ou íntegro (quadrante inferior esquerdo). Células do cumulus compactas (G), visualização da zona pelúcida (ZP). B) Presença da Vesícula Germinativa (VG), citoplasma íntegro com características de oócito viável. C) Oócito com retração do citoplasma. D) Presença do Corpúsculo polar (CP) e expansão das células do cumulus (G).

Tabela 1- Produção de blastocisto após diferentes tratamentos no meio de maturação. O tratamento Ros indica a presença de Roscovitina e IGF-I no meio, enquanto o tratamento Ros+CY indica a presença de Roscovitina e Cordicepim mais IGF-I. Grupo controle sem adição de inibidores e grupo DMSO para testar a toxicidade do DMSO.

Tratamento	Oócito <i>n</i>	Clivagem		Blastocisto/oócito		Blastocisto/ Clivagem (%)
		n	%	n	%	
Controle	51	44	86,3 ^{ab}	25	49,0 ^{ab}	56,8 ^{ab}
DMSO	53	48	90,6 ^a	19	35,8 ^{ab}	39,6 ^{ac}
Ros	42	30	71,4 ^{bc}	7	16,7 ^c	23,3 ^c
Ros+CY	53	29	54,7 ^c	20	37,7 ^b	69,0 ^b

Números na coluna com diferentes sobrescritos diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Efeito de diferentes concentrações de Ros e CY no meio de maturação sobre a produção de blastocisto. Os nomes dos tratamentos indicam o produto usado e os números a concentração. Ros indica a presença de Roscovitina, enquanto CY indica Cordicepim. As concentrações de cada produto vem logo após a sua sigla e esta em $\mu\text{M}/\text{ml}$ para o Ros e em $\mu\text{g}/\text{ml}$ para o CY.

Tratamento	Oócito <i>n</i>	Clivagem		Blastocisto/oócito		Blastocisto/ Clivagem (%)
		n	%	n	%	
Controle	77	60	77,9 ^a	28	36,4 ^a	46,7 ^a
Ros25/CY20	66	39	59,1 ^b	15	22,7 ^{ab}	38,5 ^a
Ros25/CY10	94	56	59,4 ^b	20	21,9 ^{bc}	35,7 ^a
Ros12,5/CY20	50	22	44,0 ^b	7	14,0 ^{bc}	31,8 ^{ab}
Ros12,5/CY10	48	29	60,7 ^b	4	8,3 ^c	13,9 ^b

Números na coluna com diferentes sobrescrito, são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAE, I.H.; CHANNING, C.P. Effect of calcium-ion on the maturation of cumulus-enclosed pig follicular oocytes isolated from medium-sized graafian-follicles. **Biology of Reproduction**, v.33, p.79-87, 1985.

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

BEVERS, M.M. et al. Developmental competence of bovine oocytes after specific inhibition of MPF kinase activity: Effect of estradiol supplementation and follicle size. **Animal Reproduction Science**, v.92, p.231-240, 2006.

BERRIDGE, M.J. The molecular basis of communication within the cell. **Scientific American**, v.253, p.142-152, 1985.

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

BRATU, D. P. et al. Visualizing the distribution and transport of mRNAs in living cells. **PNAS**, v.100, p.13308–13313, 2003.

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

BREVINI, T.A.L. et al. Evolution of mRNA polyadenylation between oocyte maturation and first embryonic cleavage in cattle and its relation with developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, v.63, p.510–517, 2002.

CHESNEL, F.; EPPIG, J.J. Synthesis and accumulation of p34^{cdc2} and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. **Molecular Reproduction Development**, v.40, p.503-508, 1995.

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

DAUGHADAY, W.H.; ROTWEIN, P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentration. **Endocrine Reviews**, v.10, p.68-92, 1989.

DEMEESTERE, I. et al. Effect of insulin-like growth factor-I during preantral follicular culture on steroidogenesis, in vitro oocyte maturation, and embryo development in mice. **Biology of Reproduction**, v.70, p.1664-1669, 2004.

- De VANTERY, C. et al. An accumulation of p34cdc2 at the end mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. **Developmental Biology**, v.174, p.335-344, 1996.
- DEKEL, N. Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. **Reviews of Reproduction**, v.1, p.82-88, 1996.
- ERICKSON, B.H. Developmental and radio-response of the prenatal bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.10, p.97-105, 1966.
- FAIR, T. et al. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, v.42, p.437-442, 1995.
- FAIR, T. et al. Nucleolus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v.43, p.503-512, 1996.
- FARIN, C.E.; YANG, L. Inhibition of germinal vesicle breakdown in bovine oocytes by 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB). **Molecular Reproduction and Development**, v.37, p.284-292, 1994.
- FISSORE, R.A.; HE, C.L.; 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.
- FOULADI NASHTA, A.A.; WADDINGTON, D.; CAMPBELL, K. H. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development in vitro: A comparative evaluation of antral follicle culture with others methods. **Biology of Reproduction**, v.59, p.255-262, 1998.
- GINTHER, O.J. et al. Activin A, estradiol, and free insulin-like growth factor I in follicular fluid preceding the experimental assumption of follicle dominance in cattle. **Biology of Reproduction**, v.67, p.14-19, 2002.
- GINTHER, O.J. et al. In vivo effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor 1 on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. **Biology of Reproduction**, v.70, p.99-105, 2004.
- GORDON, I. Laboratory Production of Cattle Embryo. **CAB International, University Press, Cambridge**, 640p, 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.
- HOMA, S.T. Effects of cyclic AMPc on the spontaneous meiotic maturation of cumulus-free bovine oocytes cultured in the chemically defined medium. **Journal of Experimental Zoology**, v.248, p.222-231, 1988.
- HURK, R., ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717-1751, 2005.

HUSSEIN, T.S. et al. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Developmental Biology**, v.296, p.514-521, 2006.

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

HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.

JOHNSTON, D. S. The intracellular localization of messenger RNAs. **Cell**, v.81, p.161-170, 1995.

KAUFMAN, M.L.; HOMA, S.T. Defining a role for calcium in the resumption and progression of meiosis in the pig oocyte. **Journal of Experimental Zoology**, v.265, p.69-76, 1993.

KRISCHEK, C.; MEINECKE, B. In vitro maturation of bovine oocytes requires polyadenylation of mRNAs coding proteins for chromatin condensation, spindle assembly, MPF and MAP kinase activation. **Animal Reproduction Science**, v.73, p.129-140, 2002.

KUBELKA, M. et al. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, v.62, p.292-302, 2000.

KUMAGAI, A.; DUNPHY, W.G. Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. **Cell**, v.70, p.139-151, 1992.

JAGGER, D.V.; KREDICH, N.M.; GUARINO, A.J. Inhibition of Ehrlich mouse ascites tumor growth by Cordicepim. **Cancer Research**, v.21, p.216-220, 1960.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. et al. Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, v.36, p.376-383, 1987.

LEIVAS, F. G. et al. Transport of bovine oocytes in maturation medium without a controlled gaseous atmosphere. **Ciência Rural**, v.34, p.219-224, 2004.

LONERGAN, P. et al. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. **Biology of Reproduction**, v.54, p.1420-1429, 1996.

LONERGAN, P. et al. Effect of protein synthesis inhibition before or during in vitro maturation on subsequent development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.50, p.417-431, 1998.

LONERGAN, P. et al. Relationship between time of first cleavage and expression of IGF-I growth factor, its receptor and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.57, p.146-152, 2000.

- MATSUI, M. et al. Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) is mediated through the IGF-I receptor. **Theriogenology**, v.48, p.605-616, 1997.
- MALLER, J.L. Biochemistry of cell cycle checkpoints at the G2/M and metaphase/anaphase transitions. **Seminars in Developmental Biology**, v.5, p.183-190, 1994.
- MEIJER, L., et al. Biochemical and cellular effects of Roscovitina, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. **European Journal of Biochemistry**, v.243, p.527-536, 1997.
- MERMILLOD, P. et al. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, p.89-95, 2000.
- MOREIRA, F. et al. 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.
- MOTLIK, J.; KUBELKA, M. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.27, p.366-375, 1990.
- MOTTA, P.M.; NOTTOLA, S.A.; MAKABE, S. Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.75, p.5-10, 1997.
- NURSE, P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. **Nature**, v.344, p.503-508, 1990.
- PALMA, G.A.; MULLER, M.; BREM, G. Effect of insulin-like growth factor (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.110, p.347-353, 1997.
- PICTON, H., DAVID, B., ROGER G. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.145, p.27-37, 1998.
- PONDERATO, N. et al. Bovine oocytes treated prior to in vitro maturation with a combination of butyrolactone I and Roscovitina at low doses maintain a normal developmental capacity. **Molecular Reproduction and Development**, V.60, p.579-585, 2001.
- PONDERATO, P. et al. Embryonic and foetal development of bovine oocytes treated with a combination of butyrolactone I and Roscovitina in an enriched medium prior to IVM and IVF. **Molecular Reproduction and Development**, v.62, p.513-518, 2002.
- RIEGER, D. et al. The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes in vitro. **Reproduction**, v.112, p.123-130, 1998.

- RICHARDS, J. Maturation of ovarian follicles: Actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiology Reviews**, v.60, p.51-89, 1980.
- RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.234-248, 2002.
- SAEKI, K. et al. Developmental capacity of bovine oocytes following inhibition of meiotic resumption by cycloheximide or 6-dimethylaminopurine. **Theriogenology**, v.48, p.1161-1172, 1997.
- SAKAGUCHI, M. et al. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factor in vitro. **Reproduction**, v.123, p.135-142, 2002.
- SIRARD, M.A. 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. Temporary inhibition of in vitro meiotic resumption in vitro by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v.33, p.757-767, 1990.
- SIRARD, M. A.; COENEN, K. Effects of inhibition of meiotic resumption upon the subsequent development of bovine oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Development**, v.41, p.255-262, 1994a.
- SIRARD, M., Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v.55, p.1241-1254, 2000.
- SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v.55, p.1241-1254, 2001.
- SIRARD, M., et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.126-136, 2006.
- SEBASTIA, L.M., KELLER, W. mRNA polyadenylation and its coupling to other RNA processing reactions and to transcription. **Cell Biology**, v.11, p.352-357, 1999.
- SUGAR, A.M.; MCCAFFREY, R.P. Antifungal Activity of 39-Deoxyadenosine (Cordicepin). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, p.1424-1427, 1998.
- 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.
- WU, B. et al. 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.

YASSEN, M.A. et al. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems. **Reproduction**, v.122, p.601-610, 2001.