



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MATURAÇÃO PARA  
AUMENTAR A COMPETÊNCIA DE OVÓCITOS BOVINOS**

**ANA LUIZA SILVA GUIMARÃES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA**  
**FEVEREIRO/2013**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MATURAÇÃO PARA  
AUMENTAR A COMPETÊNCIA DE OVÓCITOS BOVINOS**

**ALUNO (A): ANA LUIZA SILVA GUIMARÃES**

**ORIENTADOR (A): MARGOT ALVES NUNES DODE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO 81/2013**

**BRASÍLIA**  
**FEVEREIRO/2013**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

GUIMARÃES, A.L.S. **Avaliação de diferentes sistemas de maturação para aumentar a competência de ovócitos bovinos**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 84p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

GUIMARÃES, A.L.S. **Avaliação de diferentes sistemas de maturação para aumentar a competência de ovócitos bovinos**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 84p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Veterinária da Universidade de Brasília, 2013.

1. Cilostamida. 2. Cultivo de pré-maturação. 3. SPOM. 4. retenção meiótica. I DODE, M.A.N. II PhD.

**Àqueles que estiveram sempre ao meu lado durante essa caminhada, *dedico...***

**Aos meus filhos Ana Sofia, Mateus e Ana Júlia, que são a razão por todo esforço e empenho. Pelo carinho e amor que sempre me transmitem; Hoje posso dizer que sou uma pessoa melhor, pelo simples fato de ser mãe. Amo vocês!**

**Ao meu esposo e maior incentivador, Demis Menezes, sempre me apoiando em momentos importantes; mostrando com seu exemplo de vida que, por mais sinuoso que seja o nosso caminho, devemos ser persistentes e nunca desistir das nossas metas.**

**Aos meus pais Odília e Leoni Guimarães, pelo amor incondicional que tem pelos meus filhos. Por sempre demonstrar que a minha felicidade é a deles também. Sou muito grata pelo exemplo de bondade e caráter que me transmitiram durante a vida.**

**À minha eterna “mãe” Francisca Maria (*in memoriam*) pelo seu exemplo de bondade e carinho... Estará sempre em meu coração.**

**À Dra. Margot Dode, pela oportunidade que me deu, me ajudando em momentos em que eu mais precisei. Pela forma que conduz seu trabalho, sendo uma pesquisadora exemplar, sempre incentivando seus alunos pela busca do conhecimento. Pela atenção que transmitiu durante todo esse tempo.**

## **AGRADECIMENTOS**

**A Deus, por me revestir de força durante essa caminhada.**

**Aos meus pais, Leoni e Odília, pelo grande apoio durante a realização deste trabalho. Pelas palavras de incentivo, pois ao longo da vida me ensinaram que para vencer devemos persistir. Por muitas vezes tiveram que ser pai e mãe dos meus filhos em momentos que eu não pude estar presente.**

**Aos meus irmãos Leoni Jr. e João Marcelo por serem grandes parceiros, podendo compartilhar esse momento tão especial.**

**Aos pesquisadores do LRA, Bianca Damiani, Eduardo Melo, Maurício Machaim e Ricardo Alamino pela contribuição de ensinamentos científicos.**

**Aos funcionários Regivaldo Vieira, do LRA, “Rambinho” e “Zequinha” do CES, pelo apoio durante a realização dos experimentos.**

**Ao amigo e “slave” Sidney Alcântara, pelo carinho e apoio durante a realização do experimento. Por diversas vezes oferecendo ajuda para que eu pudesse realizar uma outra tarefa importante: ser mãe. Muito obrigada!**

**Aos queridos amigos e colegas do LRA ou que já trabalharam, Anelise, Andrielle, Alices, Tiago, Juliana, José Carvalho, José Sprícigo, Isabela, Rosana, Grazieli, Ligiane, Mateus, gostaria de expressar a minha gratidão a cada um de vocês, pelos momentos que passamos juntos durante essa jornada. Muito obrigada a cada um pela ajuda efetiva no experimento.**

**Ao frigorífico Qualimax (Luziânia-GO) por ceder material biológico para a realização desse experimento.**

**A CAPES pelo apoio financeiro.**

## ÍNDICE

|   | <b>PÁGINAS</b> |
|---|----------------|
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>   | <b>viii</b>    |
| <b>LISTA DE TABELAS</b>   | <b>ix</b>      |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>  | <b>xi</b>      |
| <b>RESUMO</b>   | <b>xiv</b>     |
| <b>ABSTRACT</b>   | <b>xvi</b>     |
| <b>CAPÍTULO 1</b>   |                |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>   | <b>1</b>       |
| <b>1.1 OBJETIVO GERAL</b>   | <b>4</b>       |
| <b>1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO</b>  | <b>4</b>       |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>  | <b>5</b>       |
| <b>2.1 FORMAÇÃO DO OVÓCITO E DO FOLÍCULO</b>  | <b>5</b>       |
| <b>2.1.1 OVOGÊNESE</b>  | <b>5</b>       |
| <b>2.1.2 FOLICULOGÊNESE</b>   | <b>6</b>       |
| <b>2.2 MATURAÇÃO E COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA</b>   | <b>9</b>       |
| <b>2.2.1 MATURAÇÃO OVOCITÁRIA</b>   | <b>10</b>      |
| <b>2.2.2 COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA</b>   | <b>12</b>      |
| <b>2.3 CONTROLE DA RETENÇÃO E RETOMADA DA MEIOSE</b>  | <b>14</b>      |
| <b>2.4 INIBIÇÃO DA MEIOSE</b>   | <b>16</b>      |
| <b>2.4.1 INIBIDORES FISIOLÓGICOS</b>  | <b>17</b>      |
| <b>2.4.2 AGENTES MODULADORES DO AMPc</b>  | <b>18</b>      |
| <b>2.4.3 AGENTES INIBIDORES DA ATIVIDADE QUINASE</b>  | <b>20</b>      |
| <b>2.5 MÉTODOS ALTERNATIVOS UTILIZANDO INIBIDORES DA MEIOSE</b>   | <b>21</b>      |
| <b>2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>   | <b>23</b>      |
| <b>CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MATURAÇÃO PARA AUMENTAR A COMPETÊNCIA DE OVÓCITOS BOVINOS</b> |                |
| <b>1.RESUMO</b>   | <b>39</b>      |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>2.ABSTRACT</b>   | <b>41</b> |
| <b>3. INTRODUÇÃO</b>  | <b>46</b> |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>  | <b>46</b> |
| <b>4.1 REAGENTES QUÍMICOS</b>   | <b>46</b> |
| <b>4.2 RECUPERAÇÃO E SELEÇÃO DE OVÓCITOS ORIUNDOS DE FOLÍCULOS DE 3-8 mm</b>  | <b>46</b> |
| <b>4.3 OBTENÇÃO DE OVÓCITOS ORIUNDOS DE FOLÍCULOS DE 1-3 mm</b>   | <b>47</b> |
| <b>4.4 MATURAÇÃO IN VITRO</b>   | <b>47</b> |
| <b>4.5 SOLUÇÃO ESTOQUE DOS INIBIDORES</b>   | <b>47</b> |
| <b>4.6 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE MATURAÇÃO NUCLEAR</b>   | <b>48</b> |
| <b>4.7 SELEÇÃO ESPERMÁTICA E FECUNDAÇÃO IN VITRO</b>  | <b>49</b> |
| <b>4.8 CULTIVO IN VITRO</b>   | <b>50</b> |
| <b>4.9 CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS</b>  | <b>50</b> |
| <b>4.10 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS DO CUMULUS</b>   | <b>51</b> |
| <b>4.11 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b>   | <b>51</b> |
| <b>4.11.1 AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA SPOM PARA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS</b>   | <b>51</b> |
| <b>4.11.2 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE MATURAÇÃO NUCLEAR E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE OVÓCITOS SUBMETIDOS À INIBIÇÃO POR 8 E 24 HORAS</b> | <b>54</b> |
| <b>4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>   | <b>57</b> |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>  | <b>58</b> |
| <b>5.1 RESULTADOS</b>   | <b>58</b> |
| <b>5.2 DISCUSSÃO</b>  | <b>68</b> |
| <b>6. CONCLUSÕES</b>  | <b>75</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | <b>76</b> |





**LISTA DE FIGURAS**

| <b>Figura</b>  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| <b>CAPÍTULO 1</b>  |               |
| 1. Esquema representativo da ovogênese e foliculogênese  | 7             |
| 2. Esquema representativo do mecanismo de retenção da meiose em ovócito (Adaptado de Triphati et al., 2010). O AMPc e GMPc produzido nas células foliculares e do <i>cumulus</i> e são transferidos para o ovócito pelas junções gap. O GMPc inativa a PDE3, inibindo a hidrólise do AMPc e a manutenção dos altos níveis de AMPc no ovócito ativa a PKA, mantendo fosforilado os resíduos de tirosina 14 e treonina 15 da subunidade Cdk1 do MPF mantendo-o inativo, dessa forma, retém o ovócito em VG.  | 15            |
| 3. Esquema representativo do mecanismo da retoma da meiose em ovócito. Adaptado de Triphati et al., 2010. O LH se liga a seus receptores presentes nas células da granulosa, que desencadeia uma cascata de fosforilação e desfosforilação, envolvendo o AMPc e GMPc como segundo mensageiros. A ruptura das junções gap reduz a transferência de GMPc para o ovócito, que leva à ativação da PDE3 e a redução dos níveis intraovocitários de AMPc inativa a PKA, tendo como resultado a ativação do complexo Cdk 1 do MPF, tendo como resultado a retomada da meiose. | 16            |
| <b>CAPÍTULO 2</b>  |               |
| 4. Avaliação dos estágios da meiose de ovócitos corados com Lacmóide a 45%. A: Vesícula Germinativa- VG; B: Metáfase I-  |               |

MI, C: Anáfase I- AI, D:Telófase I- TI, E: Metáfase II- MII. Seta preta indica a placa metafásica e seta vermelha indica 1º corpúsculo polar; F: anormal-degenerado (anormalidade apresentada como fusos multidirecionais). 100X.

49

5. A) Mensuração dos embriões em D7 pela Motic Plus 2.0 e

B) Embriões D7 corados com Hoeschst 33342 para contagem

do número de células

51

6. Esquema representativo do delineamento da 1º etapa do experimento 1

52

7. Esquema representativo do delineamento da 2º etapa do experimento 1.

52

8. Esquema representativo do delineamento da 3º etapa do experimento 1.

53

9. Esquema representativo do delineamento da 1º etapa do experimento 2.

54

10. Esquema representativo do delineamento da 1º etapa do experimento 2.

55

11. Esquema representativo do delineamento da 2º etapa do experimento 2.

55

12. Esquema representativo do delineamento da 2º etapa do experimento 2.

56

13. Esquema representativo do delineamento da 2ª etapa do experimento 2.

57

14. Viabilidade de células do *cumulus* de ovócitos através da coloração de Azul de Trypan, dos grupos Controle 0 e 24 horas e submetidos à inibição com 10  $\mu$ M de cilostamida e 0,05 mg/ml de ITS por 8 (PM8+MIV0) ou 24 horas (PM24+MIV0) e posteriormente maturados por 18 horas (PM8+MIV18 e PM24+MIV18).

65

## LISTA DE TABELAS

| <b>Tabela</b>   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>CAPÍTULO 2</b>   |               |
| 1. Avaliação do desenvolvimento embrionário de ovócitos bovinos submetidos ao sistema que simula a maturação ovocitária fisiológica (SPOM) e a maturação convencional (Controle). Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa por $\chi^2$ ( $P < 0,05$ ).  | 58            |
| 2. Avaliação do desenvolvimento embrionário de ovócitos bovinos submetidos à simulação fisiológica de maturação ovocitária (SPOM) e a maturação convencional (Controle) de ovócitos obtidos de folículos de 3-8 mm (utilizados rotineiramente) e de folículos dissecados de 1-3 mm (ovócitos incompetentes). Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa por $\chi^2$ ( $P < 0,05$ ). | 59            |
| 3. Avaliação do desenvolvimento embrionário de ovócitos bovinos submetidos à simulação fisiológica de maturação ovocitária (SPOM) em que foi utilizado FSH ou FSH recombinante (FSHr), baixa ( $\downarrow O_2$ ) na presença de soro e alta ( $\uparrow O_2$ ) de oxigênio na presença de BSA. Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa por $\chi^2$ ( $P < 0,05$ ).              | 60            |
| 4. Percentagem, mensuração e número total de células de embriões D8 com diâmetro $> 160\mu\text{m}$ obtidos de ovócitos ao Sistema SPOM de maturação <i>in vitro</i> nas condições de baixa ( $\downarrow O_2$ ) e alta ( $\uparrow O_2$ ) tensão de oxigênio, suplementado com FSH recombinante (FSHr) ou FSH porcino. Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).   | 60            |

5. Avaliação do bloqueio de ovócitos bovinos cultivados no meio de maturação suplementado (I) ou não com cilostamida (Controle) por 0, 8 e 24 horas (h). VG: vesícula germinativa; VGBD: rompimento da vesícula germinativa; MI AI e TI: metáfase I, anáfase I e telófase I, respectivamente; MII: metáfase II, respectivamente. Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa por  $\chi^2$  ( $P < 0,05$ ). 61

6. Avaliação da maturação nuclear de ovócitos bovinos cultivados no meio de pré-maturação suplementado com cilostamida (20  $\mu$ M), (0,5 mg/ml) ITS por 8 e 24 horas e posteriormente maturados *in vitro* por 18 e 24 horas. VG: vesícula germinativa; VGBD: rompimento da vesícula germinativa; MI AI e TI: metáfase I, anáfase I e telófase I, respectivamente; MII: metáfase II, respectivamente. Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa por  $\chi^2$  ( $P < 0,05$ ). 62

7. Desenvolvimento embrionário de ovócitos bovinos submetidos à pré-maturação acrescida de 20 $\mu$ M de cilostamida e 0,05mg/ml de ITS, pelo período de 8 ou 24 horas, e posteriormente maturados *in vitro* por 18 horas. Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa por  $\chi^2$  ( $P < 0,05$ ). 63

8. Percentagem, mensuração e número total de células de embriões D7 com diâmetro > 160 $\mu$ m obtidos de ovócitos submetidos à pré-maturação por 8 (PM8+MIV 18) ou 24 horas (PM24+MIV 18) na presença de 20 $\mu$ M de cilostamida e 0,05 mg/ml de ITS e, posteriormente maturados *in vitro* por 18 horas. Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). 63

9. Desenvolvimento embrionário de ovócitos submetidos à pré-maturação por 8 e 24 horas na presença de 20 $\mu$ M (n) ou 10  $\mu$ M (1/2) de cilostamida e

0,05mg/ml de ITS seguido de MIV por 18 horas. Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa por  $\chi^2$  ( $P < 0,05$ ).

64

10. Percentagem, mensuração e número total de células de embriões D7 com diâmetro  $> 160\mu\text{m}$  obtidos de ovócitos submetidos à pré-maturação por 8 (PM8+MIV 18) ou 24 horas (PM24+MIV18) com  $20\mu\text{M}$ (n) ou  $10\mu\text{M}$  (1/2) de cilostamida e 0,05mg/ml de ITS, pelo período de 8 ou 24 horas, e posteriormente maturados *in vitro* por 18 horas. Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

65

11. Desenvolvimento embrionário de ovócitos submetidos à pré-maturação por 8 e 24 horas, seguido de MIV por 18 h, com a metade a concentração de  $10\mu\text{M}$  ([1/2]) de cilostamida e sem adição de ITS no meio pré-maturação. Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa por  $\chi^2$  ( $P < 0,05$ ).

66

12. Percentagem, mensuração e número total de células de embriões D7 com diâmetro  $> 160\mu\text{m}$  obtidos de ovócitos submetidos à pré-maturação por 8 (PM8+MIV 18) ou 24 horas (PM24+MIV18) com  $10\mu\text{M}$  (1/2) de cilostamida e sem a adição de ITS e posteriormente maturados *in vitro* por 18 horas. pré-maturação. Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

67

**LISTA DE ABREVIATURAS**

A I = Anáfase I  
AC = Adenil ciclase  
AC<sub>i</sub> = Adenil ciclase invasiva  
AMPc = Adenosina Monofosfato cíclico  
AMH = Hormônio Anti-Mulleriano  
ATP = Trifosfato de adenosina  
Bl = Blastocisto  
BSA-FAF = Albumina sérica bovina- *Fat albumine free*  
BMP-15 = Proteína morfogenética óssea -15  
°C = Graus Celsius  
Cdc = ciclo de divisão celular  
Cdk = quinase dependente de ciclinas  
CIV = Cultivo *in vitro*  
CO<sub>2</sub> = Dióxido de carbono  
COC = Complexo *cumulus*-ovócito  
CP = Corpúsculo polar  
DNA = Ácido desoxirribonucléico  
DPM = Desvio padrão da média  
6- DMAP = 6- Dimetilaminopurina  
EGF = Fator de crescimento epidermal  
FF = Fluido folicular  
FIV = Fecundação *in vitro*  
FSH = Hormônio folículo estimulante  
FSHr = Hormônio folículo estimulante recombinante  
FGF-2 = Fator de crescimento de fibroblasto do tipo 2  
GDF-9 = Fator de crescimento e diferenciação – 9  
GMPc = Guanosina monofosfato cíclico  
GPCR = Receptor da proteína G acoplada  
GVBD = Quebra da vesícula germinativa  
hpi = Horas pós-inseminação  
IBMX = 1- isobutil, 3- metilxantina



ITS = Insulina-transferrina-selênio

KL = Kit Ligand

LH= Hormônio luteinizante

LRA = Laboratório de Reprodução Animal

M I= Metáfase I

MII= Metáfase II

MAP= Proteína ativada por mitógeno

MAPK= Proteína ativada por mitógeno quinase

MPF = Fator de promoção da maturação

MIV= Maturação *in vitro*

mL= Mililitro

mm= Milímetro

mM= Milimol

N= Número

N<sub>2</sub>= Nitrogênio

O<sub>2</sub>= Oxigênio

OMI= Inibidor de maturação ovocitária

PBS= Solução salina em tampão fosfato

PDE = fosfodiesterase

PHE= Penicilamina, hipotaurina e epinefrina

PIV= Produção *in vitro* de embriões

RNA= Ácido ribonucléico

SFB= Soro fetal bovino

SOF aaci= Fluido sintético do oviduto com aminoácidos

SPOM = *Simulated physiological oocyte maturation*

T I= Telófase I

TALP= *Tyrode's Albumin Lactate and Pyruvate*

TCM 199.= *Tissue culture medium 199*

TGF-β = Fator de crescimento tumoral beta

TRA = Técnicas de reprodução assistida

UI= Unidade Internacional

VG= Vesícula germinativa

μL= Microlitro

μM= Micromol

%= Porcentagem

## RESUMO

### AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MATURAÇÃO PARA AUMENTAR A COMPETÊNCIA EM OVÓCITOS BOVINOS

Ana Luiza Silva Guimarães<sup>1</sup>, Margot Alves Nunes Dode<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Médica Veterinária, Brasília-DF, Brasil, <sup>2</sup>Pesquisadora PhD, Brasília-DF, Brasil

O sucesso da utilização da maioria das técnicas de reprodução assistida (TRA) depende da disponibilidade de ovócitos saudáveis e no estágio adequado para seu uso. Como um dos fatores limitantes na utilização das TRAs é a disponibilidade de ovócitos competentes, é importante buscar alternativas para auxiliar esses ovócitos melhorando com isso a eficiência dessas técnicas. O objetivo deste trabalho foi testar dois diferentes sistemas de maturação, o sistema SPOM (*Simulated Physiological Oocyte Maturation*) e a retenção meiótica na presença de ITS (Insulina-transferrina-Selênio), para aumentar a competência do ovócito e conseqüentemente incrementar a produção de embriões *in vitro*. Os ovócitos foram obtidos de ovários de abatedouro, sendo que os provenientes de folículos de 1-3 mm foram dissecados da córtex ovariana e os de 3-8 mm, obtidos por punção folicular. Para a avaliação dos estágios de maturação nuclear, os ovócitos foram corados com lacmóide e para verificar o efeito dos sistemas de MIV na produção de embriões, foi avaliada a taxa de clivagem, blastocisto, tamanho dos embriões e número total de células. O corante azul de Trypan foi utilizado para verificar a viabilidade das células do *cumulus* após a retenção. Os dados de taxa de maturação nuclear e desenvolvimento embrionário foram avaliados pelo teste do  $\chi^2$ , e os dados referentes a tamanho e número de células pelo teste de Kruskal-Wallis. O primeiro sistema de maturação a ser testado foi o sistema SPOM em ovócitos de folículos aspirados, com a dose 0,01 UI/ml de FSH, utilizada na MIV convencional, onde as taxas de clivagem, D7 e D8 foram drasticamente reduzidas ( $P < 0,05$ ) quando comparadas com as do grupo controle. O aumento da dose de FSH para 0,1 UI/ml, no sistema SPOM, em ovócitos obtidos de folículos de 1-3 mm não aumentou a produção

de embriões ( $P < 0,05$ ), entretanto em ovócitos obtidos de folículos de 3-6 mm teve efeito prejudicial, sendo as taxas de clivagem e blastocistos inferiores ( $P < 0,05$ ) as do grupo controle. Da mesma forma, quando o SPOM foi utilizado na presença de FSH recombinante (FRSr), de BSA como suplemento dos meios e o cultivo realizado sob baixa tensão de  $O_2$ , uma redução ( $P < 0,05$ ) na taxa de blastocisto foi observada, mas o tamanho e número de células dos embriões foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) aos do controle. A segunda alternativa testada foi o uso da cilostamida, inibidor da PDE3, e ITS no cultivo de pré-maturação por 8 e 24 horas. Na concentração de  $20\mu M$ , a cilostamida reteve 91% dos ovócitos em VG por até 24 horas, entretanto o desenvolvimento embrionário destes embriões foi comprometido, com baixas taxas de clivagem e de embriões em D7 ( $P < 0,05$ ). Foi também avaliada a diminuição da concentração de cilostamida durante o bloqueio e a presença do ITS. Foi observado que a redução da concentração de cilostamida associada ao período menor de retenção causou um aumento da produção de blastocisto semelhante às taxas obtidas para o controle e que o ITS não afetou ( $P > 0,05$ ) a resposta dos ovócitos a retenção com cilostamida. Conclui-se que o sistema SPOM utilizando FSHr, BSA e baixa tensão de  $O_2$  afetou o desenvolvimento embrionário. Além disso, a cilostamida quando utilizada para bloquear a meiose tem efeito deletério nos ovócitos e células do *cumulus* se utilizada por 24 horas na concentração de  $20\mu M$ . A menor concentração ( $10\mu M$ ) e menor tempo de exposição (8 horas) pode amenizar esse efeito, mas também não causa nenhum incremento na produção de embriões. A presença de ITS durante o bloqueio não afeta a produção de embriões. Mais estudos devem ser realizados na tentativa de utilizar a retenção para incrementar a qualidade de ovócitos utilizados para as TRAs.

Palavras-Chave: Cilostamida, cultivo de pré-maturação, SPOM, retenção meiótica.

**ABSTRACT****EVALUATION FROM DIFFERENTS MATURATION SYSTEMS TO INCREASE THE COMPETENCE IN BOVINE OOCYTES**

Ana Luiza Silva Guimarães<sup>1</sup>, Margot Alves Nunes Dode<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Veterinary, Brasília-DF, Brazil, <sup>2</sup>Reseacher, PhD, Brasília-DF, Brazil

The successful use of most assisted reproductive techniques (ART) depends on the availability of healthy and competent oocytes. Considering that one of the limiting factors for using ART's is the availability of good quality oocytes, it is important to find new alternatives which could help those oocytes and then improving the efficiency of these biotechnology. The aim of this study was to test two different maturation systems, the SPOM (*simulated physiological oocyte maturation*) methodology and the meiotic inhibition in the presence of ITS (Insulin-Transferrin-Selenium), to improve oocyte competence and consequently, the in vitro embryos production. Oocytes were obtained from slaughter house ovaries, being those from follicles from 3-8 mm diameter were obtained by aspiration and those from 1-3mm follicles by dissection. To evaluate maturational stage oocytes were stained with lacmoid, and to verify the effect of maturation system on in vitro embryos production cleavage rate, blastocyst at D7 and D8 rates, embryo size and total cell number were used. The trypan blued stain was used to evaluate cumulus cells viability after meiotic inhibition. Data of nuclear maturation and embryo development were evaluated by the  $\chi^2$  test and those of embryo size and total cell number by Kruskar-Wallis test. At first, SPOM system was tested in aspirated

oocytes, with 0.01 IU/ml of FSH, used in conventional IVM, where rates of cleavage, D7 and D8 were drastically reduced compared to control ( $P < 0.05$ ). Increasing the dose of FSH to 0.1 IU/ml in the SPOM system did not affect ( $P < 0.05$ ) the results and embryos production remained low. When oocytes from follicles of 1-3 mm were used, although the embryo rate was low for both group, no effect of SPOM system was observed. However, when recombinant FSH (FSHr) was associated with BSA instead of FCS and culture was performed under low oxygen a reduction ( $P < 0.05$ ) on blastocyst rates were observed, but the size and total cell number were similar to the control ( $P > 0.05$ ). The second alternative to be tested was the use of cilostamide, an inhibitor of PDE3A, associated with ITS on pre-maturation culture for 8 and 24 h. Cilostamide concentration of 20 $\mu$ M retained 91% of oocytes in GV for 24 hours, however, embryonic development and quality of these embryos were compromised presented lower cleavage and blastocyst rates than the control ( $P < 0.05$ ). Decreasing cilostamide concentration and the presence of ITS associated with lower period of meiotic inhibition was also evaluated. It was observed that lower concentration (10 $\mu$ M) during less time of inhibition (8h) caused an increase in embryo production being the rates similar to the control (40.7% vs 51.8%) and that ITS had no effect ( $P > 0.05$ ) oocyte response to cilostamide inhibition. It can be concluded that SPOM using FSHr, BSA and low O<sub>2</sub> tension does not affect embryo development. In addition, cilostamide had a deleterious effect in oocytes and cumulus cells when used for 24 h at 20  $\mu$ M concentration to inhibit meiosis. Lower concentration (10 $\mu$ M) with less time of exposure (8 hours) eliminated the deleterious effect but did not increase embryo production. More studies are needed to establish the use of meiotic inhibition associated with other substances to improve oocyte quality to be use on ART's.

Keywords: Cilostamide, pre-maturation culture, SPOM, meiotic arrest.

## **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO

Técnicas de reprodução assistida (TRAs) são cada vez mais utilizadas tanto em humanos, para resolver casos de infertilidade, como em animais para a multiplicação rápida de material genético e/ou preservação de germoplasma. O sucesso da utilização da maioria dessas técnicas depende da disponibilidade de ovócitos saudáveis e no estágio adequado para seu uso. Dentre as TRAs, a produção *in vitro* de embriões (PIVE), é a mais difundida e estudada para bovinos, sendo a responsável por posicionar o Brasil no cenário mundial em uso de biotécnicas reprodutivas.

Apesar dos avanços obtidos e de já estar sendo rotineiramente utilizados há mais de 10 anos, os índices da PIVE tem permanecido estáveis, ou seja, a taxa de maturação nuclear e fecundação em torno de 80% e a de blastocisto entre 35-40% (Pontes et al., 2011), sendo que somente cerca de 30% (Pontes et al., 2009) destes embriões são capazes de gerar uma prenhez após a transferência. Entretanto, quando os ovócitos são maturados *in vivo*, as taxas de blastocistos são superiores quando comparado as de ovócitos maturados *in vitro*. Esses resultados mostram que a maturação é ainda um dos passos limitantes para o incremento na eficiência das TRAs.

O ovócito de mamífero sofre mudanças significativas durante o desenvolvimento folicular, inclusive no período em que o folículo se torna dominante e no que antecede ao pico pré-ovulatório de Hormônio Luteinizante (LH). Essas mudanças são chamadas de capacitação, e tem papel fundamental na aquisição da competência (Dielemann et al. 2002).

Entretanto, ovócitos utilizados para a maturação *in vitro* (MIV), normalmente obtidos de folículos menores (3-8 mm de diâmetro), são privados das mudanças que ocorrem durante o período de dominância folicular e/ou capacitação, pois



espontaneamente retomam a meiose quando removidos do ambiente folicular (Thomas et al., 2004). Portanto, é provável que muitos dos ovócitos recuperados para serem utilizados nas TRAs tenham um reduzido potencial de desenvolvimento devido ao fato de serem retirados antecipadamente do ambiente folicular e, não estarem totalmente competentes ou prontos para serem fecundados (Jee et al., 2009). Como um dos fatores limitantes na utilização das biotécnicas de reprodução é a disponibilidade de ovócitos competentes, é importante buscar alternativas para auxiliar esses ovócitos melhorando com isso a eficiência dessas técnicas.

Uma das alternativas seria tentar simular *in vitro* os eventos que ocorrem *in vivo* durante a retomada da meiose induzida pela liberação do LH pré-ovulatório. Baseado nesses eventos, Albuz et al. (2010) propuseram um sistema que simula a maturação fisiológica que ocorre *in vivo* denominado de SPOM (do inglês, *simulated physiological oocyte maturation*) que mostrou resultados promissores aumentando a produção de embriões. Apesar de sua eficiência ainda não ter sido avaliada e confirmada em outros laboratórios e por outros grupos de pesquisa, parece ser uma opção a ser testada, para melhorar a qualidade de ovócitos.

Outra alternativa seria evitar a retomada prematura da meiose que ocorre após a remoção dos ovócitos do ambiente folicular induzindo um bloqueio meiótico (Adona et al., 2008). O bloqueio da meiose forneceria um tempo adicional ao ovócito para que o mesmo possa sofrer modificações bioquímicas e estruturais necessárias para suportar a fecundação e ter desenvolvimento embrionário normal (Dielemann et al., 2002).

Vários métodos fisiológicos e farmacológicos têm sido utilizados para inibir a retomada da meiose em várias espécies, sendo que os fisiológicos, em geral, são de duração mais curta e menos eficientes do que os farmacológicos. Dentre os fisiológicos pode-se citar o uso de hemi-folículos e adição de fluido folicular durante o cultivo. Com relação aos fármacos, várias substâncias têm sido utilizadas para bloquear a meiose, tais como ativadores da Adenil Ciclase (AC) como o forskolin, inibidores do fator de promoção da maturação (MPF) como a 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), a roscovitina e a butirolactona-I e, inibidores da fosfodiesterase (PDE) como a cilostamida, milrinone e o 1- isobutil, 3- metilxantina (IBMX). Apesar de muitos desses métodos de bloqueio inibirem com sucesso a retomada da meiose, permitindo manter os ovócitos durante certo período retido no estágio de VG, antes de serem maturados e fecundados *in vitro*, (Kubelka et al., 2000; Dode & Adona, 2001; Adona & Leal, 2004; Barreto, 2008), os resultados obtidos mostram não haver um incremento na produção de

embriões. Entretanto, se a retenção for realizada em um ambiente mais adequado, em que fatores benéficos forem adicionados ao meio durante esse período, é possível que o ovócito possa se preparar para a maturação completa e melhorar o seu desenvolvimento posterior. Portanto, alternativas utilizando diferentes inibidores associados à suplementação do meio de retenção ainda precisam ser estudadas.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Geral

O presente trabalho teve por objetivo testar metodologia SPOM e a retenção da meiose durante a pré-maturação de ovócitos bovinos na quantidade e qualidade de embriões produzidos *in vitro*.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o sistema SPOM adaptado ao sistema de MIV utilizado no LRA para aumentar a competência de ovócitos bovinos e a produção e qualidade de embriões *in vitro*;
2. Avaliar a eficácia da cilostamida como inibidor da maturação nuclear no meio de pré-maturação por 8 ou 24 horas e a sua reversibilidade após a maturação ovocitária em bovinos;
3. Verificar o efeito da pré-maturação de ovócitos bovinos na presença de cilostamida e ITS no desenvolvimento embrionário *in vitro*;
4. Avaliar o efeito da inibição da meiose e adição de insulina-transferrina-selênio (ITS) pelo período de 8 e 24 horas sobre a viabilidade das células do *cumulus*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Formação do ovócito e folículo

#### 2.1.1 Ovogênese

Define-se como ovogênese a sequência de eventos pelos quais as células germinativas primordiais passam até atingirem o estágio de ovócito maturo, apto para a fecundação (Van Den Hurk & Zhao, 2005).

Ovócitos de mamíferos são originários de células indiferenciadas chamadas de células germinativas primordiais (CGP) que tem uma origem extragonadal. Durante o desenvolvimento fetal, as CGP migram do epitélio do saco vitelínico para as cristas genitais para colonizar as gônadas em formação. A migração das CGP para as cristas gonadais é controlada e dirigida pela secreção de citocinas e fatores de crescimento (Van Den Hurk & Zhao, 2005).

As CGP quando chegam às gônadas sofrem extensiva proliferação celular para a formação dos cordões sexuais, onde perdem a motilidade e são circundadas por células somáticas oriundas do mesonefro, e se diferenciam em ovogônias (McLaughlin & McIver, 2009). Posteriormente, as ovogônias entram no estágio da prófase da primeira divisão meiótica e passam a ser chamadas de ovócitos primários. A prófase é dividida em cinco fases: leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese. Na prófase, uma série de eventos ocorre, como o pareamento dos cromossomos homólogos, sinapse, que é a estreita associação entre os cromossomos e a recombinação ou “crossing over”, que é a troca de material genético. Subsequentemente, o ovócito progride para o estágio de diplóteno e entra em quiescência prolongada, chamado de estágio dictióteno. Os

ovócitos permanecem nesse estágio até entrar em atresia ou receber o estímulo hormonal, que induz a maturação (Revisado por Sánchez & Smitz, 2012).

No decorrer do desenvolvimento folicular, o ovócito permanece na fase de prófase I, entretanto, o seu crescimento continua, marcado por um período com alta atividade metabólica. Nesse período o crescimento do ovócito é contínuo, pois ele cresce cerca de 20 $\mu$ m no folículo primordial (Lucci et al., 2002) e até cerca de 124  $\mu$ m em folículos de 1-3 mm (Caixeta, 2009), enquanto que folículos maiores que 8,0 mm possuem ovócitos com uma média de 129  $\mu$ m. As principais mudanças que ocorrem durante a fase de desenvolvimento do ovócito são: formações das junções gap entre o ovócito e suas células somáticas circundantes, desenvolvimento e deslocamento do complexo de Golgi para a periferia do ovócito, desenvolvimento do retículo endoplasmático liso e das gotas lipídicas, formação dos grânulos corticais e zona pelúcida, diferenciação da mitocôndria, quebra dos centríolos, transcrição e acúmulo de RNAm maternos, que serão utilizados posteriormente para a síntese de proteína do ovócito e do desenvolvimento embrionário inicial (Fair et al. 1996; Hyttel et al., 1997).

Em resposta à onda pré-ovulatória do LH, os ovócitos, retomam a meiose e sofre o processo de maturação (Mayes & Sirard, 2001). Os ovócitos estimulados rompem a vesícula germinativa e, progride na meiose, passando pelos estágios de metáfase I, anáfase I, telófase I, completando o primeiro ciclo meiótico com a expulsão do primeiro corpúsculo polar e, imediatamente atingindo a metáfase II. Nesse estágio o ovócito é retido pela segunda vez, e permanece desta forma até o momento da fecundação (Van Der Hurk & Zhao, 2005). Com a entrada do espermatozoide no citoplasma durante a fecundação, o ovócito completa a sua segunda divisão meiótica, com a extrusão do segundo corpúsculo polar. A ploidia retorna a sua configuração inicial, (2n) com a interação do material genético (singamia), formando assim o zigoto, que dará origem ao embrião (Adona, 2006).

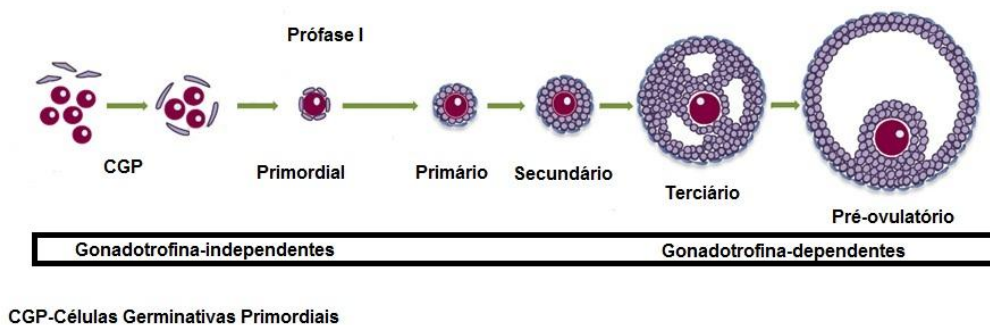
### **2.1.2- Foliculogênese**

A foliculogênese também começa durante a vida fetal e inicia-se com a formação dos folículos primordiais (Figura 1), quando uma única camada de células pavimentosas (células pré-granulosas) circunda o ovócito primário, o que ocorre em torno de 90 dias de gestação em bovinos (Meyes, 2002). Os estoques de folículos

primordiais não são renováveis e constituem o pool de reserva de folículos que servem para toda a vida reprodutiva de um indivíduo.

Em *Bos indicus*, os folículos primordiais têm em média 38  $\mu\text{m}$  contendo ovócitos com diâmetro médio de 22  $\mu\text{m}$  (Bessa, 2011). Em fetos ovinos, os folículos primordiais atingem o diâmetro de 23-53 $\mu\text{m}$ , enquanto que o diâmetro do ovócito isolado atinge 17-22  $\mu\text{m}$  (McNathy et al., 2000).

O mecanismo de ativação dos folículos primordiais para folículos primários ainda é pouco conhecido, mas já existem alguns estudos mostrando que o balanço entre fatores inibitórios e estimulatórios de origem sistêmica ou local, provavelmente regula essa ativação (Van Den Hurk & Zhao, 2005). Fatores de crescimento tumorais da família  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) como o hormônio anti-Mulleriano (AMH), ativinas, proteína morfogenética óssea-15 (BMP), fator do crescimento e diferenciação do tipo 9 (GDF-9), Kit ligand (KL), fator de crescimento de fibroblasto do tipo 2 (FGF-2) e fator de crescimento epidermal (EGF) estão implicados nessa ativação e posterior crescimento do folículo. De modo geral, esses fatores agem em receptores presentes nas células da granulosa e no ovócito de forma a estimular a deposição de camadas celulares no folículo, importantes para o crescimento e diferenciação do ovócito. O crescimento folicular ocorre em ondas, ou seja, constantemente o ovário apresenta um grupo de folículos que são ativados e entram no pool de folículos em crescimento.



**Figura 1:** Esquema representativo da ovogênese e foliculogênese. Adaptado de Sánchez & Smitz (2012).

O primeiro sinal de crescimento do folículo é a mudança na morfologia das células que circunda os ovócitos que de achatadas se tornam cubóides (células da pré-granulosa) dando origem ao folículo primário. Posteriormente, cerca de 210 dias de

gestação em bovinos, as células foliculares multiplicam-se por mitose e originam o folículo secundário, apresentando pelo menos duas camadas de células cubóides. Os folículos secundários iniciais caracterizam-se por serem menos desenvolvidos e nessa fase tem a formação da zona pelúcida ao redor do ovócito, assim como as células da teca, que se depositam em torno da lâmina basal (Fair et al., 1995). Já os folículos secundários finais possuem a zona pelúcida espessa ao redor do ovócito e a teca interna completamente formada (Kacinkis et al., 2005). Em *Bos indicus*, o tamanho do folículo secundário inicial é em média de 89  $\mu\text{m}$  com ovócito em média de 44  $\mu\text{m}$ . Já o tamanho do folículo secundário final, é em média de 193  $\mu\text{m}$  e o ovócito, média de 74 $\mu\text{m}$  (Bessa, 2011).

É também durante o crescimento folicular pré-antral que é estabelecida a formação das junções gap, que são projeções para dentro do ovócito e que permite a sua comunicação com as células da granulosa que o envolvem. É através das junções gap que ocorre o transporte de aminoácidos, metabólitos e moléculas sinalizadoras que são essenciais para o crescimento e desenvolvimento do ovócito (Gilchrist et al., 2008).

A formação de uma cavidade (antro) preenchida com um líquido é característica dos folículos antrais, que são os folículos terciários. O líquido do antro serve como uma importante fonte de substâncias regulatórias derivadas de secreções das células foliculares, como esteróides, enzimas, glicoproteínas, lipoproteínas e fatores de crescimento (Van Den Hurk & Zhao, 2005). Em relação ao diâmetro dos folículos antrais na espécie bovina, é observado em estágios iniciais o diâmetro de 1-3 mm e já em folículos pré- ovulatórios o diâmetro é cerca de 10 a 12 mm em *Bos indicus* e 12-15 mm em *bos taurus* (Ginther, 2000).

Durante a fase antral ocorre o período final de desenvolvimento folicular, que é dependente de gonadotrofinas, e que também se caracteriza pelo desenvolvimento em ondas, apresentando três fases distintas, a de recrutamento dos folículos dependentes, a seleção de um dos folículos da onda e a dominância do folículo selecionado. Na fase que compreende o recrutamento dos folículos, observa-se um aumento dos níveis do hormônio folículo estimulante (FSH). A atuação do FSH é mais direcionada às células da granulosa e resulta em uma variedade de reações, tais como a estimulação da proliferação celular, a síntese de esteroides e a expressão de receptores para EGF e LH (Revisado por Martins et al., 2008). Quando o folículo apresenta o diâmetro de 7-8 mm inicia-se a fase de desvio, que é caracterizado pelo crescimento contínuo de apenas um folículo que foi selecionado e, conseqüente inibição do crescimento dos folículos

subordinados (Ginther, 2000; Fair, 2003). A fase final de crescimento do folículo pré-ovulatório está associada à alta frequência dos pulsos de LH (Hyttel et al., 1997) e subsequente liberação de um ovócito maturo durante a ovulação (Sirard et al., 2006).

Logo após a formação da cavidade antral, por ação de substâncias que são secretadas pelo ovócito, as células murais da granulosa iniciam o processo de diferenciação e dão origem às células somáticas conhecidas como células do *cumulus*, que cercam o ovócito, formando o complexo *cumulus*-ovócito (COC). Essas células do *cumulus* são ligadas intimamente ao ovócito através das junções gap, e são responsáveis pelo crescimento e maturação do ovócito (Yeo et al., 2009). Existe uma interdependência entre essas células, ou seja, os ovócitos não conseguem metabolizar adequadamente glicose e necessitam das células do *cumulus* para fornecer piruvato, outros produtos glicolíticos e aminoácidos, que são essenciais para seu crescimento. Por outro lado, fatores secretados pelo ovócito (OSF), como o GDF-9 e BMP-15 são capazes de influenciar as células do *cumulus*, mantendo a suas características estimulando seu crescimento e regulando o seu microambiente (Eppig, 2001; Gilchrist et al., 2008).

É também através da comunicação parácrina que o ovócito confere às células do *cumulus* a capacidade de sofrerem o processo de expansão ou mucificação (Dragovick et al., 2007). A expansão das células do *cumulus* é um processo em que as células secretam ácido hialurônico formando uma rica matriz gelatinosa e viscoelástica em resposta à sinalização das gonadotrofinas. Essa expansão é necessária para fecundação *in vivo*, pois facilita a captação do ovócito pelas fímbrias do oviduto. *In vitro*, a expansão das células do *cumulus* pode ser estimulada através do uso de FSH e EGF (Diaz et al., 2007).

Dessa forma fica clara a importância vital da comunicação bidirecional entre ovócito e células do *cumulus* para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência do ovócito e dos folículos (Yeo et al., 2009).

## **2.2- Maturação e Competência Ovocitária**

### **2.2.1 Maturação ovocitária**



O processo de maturação compreende uma série de eventos nucleares e citoplasmáticos que preparam o ovócito para a fecundação (Gottardi & Mingoti, 2009).

Durante todo o período de crescimento do ovócito e de desenvolvimento folicular os ovócitos ficam retidos em estágio de diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica (Adona, 2006; Van Den Hurk & Zhao, 2005). Portanto, um ovócito de um folículo pré-ovulatório se encontra nesse estágio e, somente após o pico de LH é estimulado a retomar a meiose e sofrer o processo de maturação, completando a primeira divisão meiótica. Essa ação do LH é mediada por peptídeos específicos secretados pelas células murais da granulosa, que são os EGF (principalmente a ampirregulina e epirregulina).

A maturação nuclear se refere à retomada do primeiro bloqueio meiótico e a progressão até metáfase II (MII) (Mingoti, 2000). Portanto, envolve a quebra da vesícula germinativa – VGBD (*do inglês, vesicle germinal break down*), condensação dos cromossomos, marcando o final da prófase I e progressão pelos estádios de metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase (TI), completando a primeira divisão meiótica, passando rapidamente para metáfase MII, da segunda divisão meiótica. Nessa fase, os cromossomos homólogos são divididos, sendo que metade do número de cromossomos permanece no ovócito (célula haplóide) e a outra metade é liberada no primeiro corpúsculo polar, havendo novamente o bloqueio do ciclo celular até a fecundação (Sirard, 2001).

*In vitro*, os ovócitos bovinos levam de 18 a 24 horas para completar a MII após serem retirados dos folículos. Vários estudos têm sido feitos para determinar a cinética da maturação nuclear, e mostram que o tempo requerido na maturação nuclear pode variar entre espécies. Em bovinos a quebra da vesícula germinativa ocorre entre 8-12 horas, a MI de 12-15 horas, a AI e TI de 15-18 horas e MII de 18-22 horas após a retirada do ovócito do ambiente folicular (Sirard, 1989; Wu et al., 1996, Dode e Adona, 2001).

Na maturação citoplasmática ocorrem processos altamente complexos que envolvem vários eventos simultâneos. Dentre os vários eventos que ocorrem no citoplasma durante a maturação pode-se citar a reorganização de organelas, que migram pelos microtúbulos e microfilamentos. As mitocôndrias e o complexo de Golgi, que inicialmente se localizam em uma área periférica no ovócito imaturo, se posicionam em uma área perinuclear. Os grânulos corticais, produtos do complexo de Golgi, e que se localizavam inicialmente na porção central do ovócito, durante o processo de

maturação, migram para a periferia do mesmo, ancorando na membrana citoplasmática. Esse processo é importante para a fecundação, pois, ao liberarem seu conteúdo causam modificações na membrana plasmática e na zona pelúcida a fim de evitar a poliespermia (Quetglas, 2007).

Além disso, marcantes alterações na síntese de proteínas específicas são observadas no ovócito bovino, sendo que uma complexa cascata de fosforilação e desfosforilação está envolvida na regulação da retomada da meiose. Nesse período observa-se a degradação da adenosina monofosfato cíclico (AMPc), aumento dos níveis de cálcio e aumento na atividade de proteínas quinases. A proteína denominada de fator de promoção da maturação (MPF) é responsável pelo início da maturação, atuando de forma que assegure que o ciclo celular prossiga de forma correta (Kubelka, et al., 2000).

O MPF é um heterodímero formado pelas subunidades regulatórias ciclina B1 e catalítica p34cdc2, que é uma proteína dependente de ciclina (Cdk1). Essas subunidades formam o pré-MPF, que só é ativado quando ocorre a desfosforilação da treonina-14 e a tirosina-15 da subunidade catalítica pela fosfatase da mesma família, a Cdc25 (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., 1996; Van Den Hurk & Zhao, 2005). Essa desfosforilação que ativa o MPF, induzindo a retomada da meiose, é desencadeada por uma queda na concentração de AMPc intraovocitário (Wehrend & Meinecke, 1998).

Os ovócitos 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 da p34cdc2 para a aquisição da competência meiótica (Chesnel & Eppig, 1995; De Vantery, 1996). Como o MPF tem uma forte afinidade pela histona H1, a avaliação da fosforilação de histona H1 exógena tem sido utilizada para medir a atividade do MPF em ovócitos. Estudos utilizando essa ferramenta em bovinos tem mostrado que a atividade do MPF é menor no estágio de vesícula germinativa e tem um aumento gradual até atingir seu pico no estágio de MI (Meinecke, 2001). Após esta fase, a atividade do MPF, 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 ovócito, diminuindo gradualmente depois de 30 horas da maturação do ovócito (Wu et al., 1996).

Várias enzimas são coordenadas de modo a controlar a maquinaria de transdução de sinais extracelulares para o ambiente intracelular, de forma a estimular os efeitos

mitogênicos. Um grupo dessas enzimas é proteína quinase ativadora de mitógenos (MAPK) (Wehrend & Meinecke, 1998). Ela atua na fosforilação de diversos substratos, incluindo fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto que é responsável pela manutenção do estágio em MII da segunda parada meiótica (Blenis, 2004). Pelo fato das MAPKs serem ativadas por sinais extracelulares, as suas principais isoformas são chamadas de quinases reguladas por sinal extracelular (ERK 1 e ERK 2).

A ativação das MAPKs em ovócitos bovinos ocorre após a ativação do MPF (Dekel, 2002; Zhang et al., 2009), com aumento de atividade após a VGBD (Gordon et al., 2001) e sua atividade máxima em MII, permanecem alta até a formação dos pró-núcleos (Fissore et al., 1996). Esses relatos sugerem que a MAPK não é requerida no início da meiose, mas é essencial em eventos pós – VGBD.

### **2.2.2- Competência Ovocitária**

Competência ovocitária pode ser definida como a capacidade do ovócito de sofrer a maturação completa, fecundação, suportar o desenvolvimento embrionário, e induzir uma gestação (Mingoti, 2000). Essa competência é adquirida gradativamente durante o crescimento folicular (Pavlok et al., 2000).

Nesse contexto, para que o ovócito possa adquirir competência para maturação nuclear e citoplasmática este deverá ter completado toda a sua fase de crescimento (Adona, 2002), que ocorre quando o ovócito tem em torno de 120µm. A competência ovocitária está correlacionada com o crescimento do folículo e muita das modificações que ocorrem no citoplasma e no núcleo ocorrem na fase final de crescimento folicular e maturação. Essas modificações incluem: síntese de proteínas e armazenamento de RNAm, desenvolvimento de mecanismos reguladores de cálcio, alterações na atividade do MPF e da proteína quinase ativadora de mitógenos (MAPK) e redistribuição das organelas citoplasmáticas (Anguita et al., 2008).

Em folículos compreendidos entre 1,0-1,5 mm, os ovócitos são capazes de reiniciar a meiose, entretanto param em metáfase I. Eles são capazes de ativar a via do MPF, mas não desencadeia a cascata de proteínas da via MAPK (Kanayama et al., 2002; Miyano, 2003). Apenas ovócitos que completaram o seu total crescimento possuem capacidade para ativar as duas vias do ciclo celular (Adona, 2006). Entretanto,

na maturação *in vitro*, ovócitos que atingem o estágio de metáfase II, nem sempre estão aptos a apresentarem desenvolvimento embrionário normal após a fecundação. Isso porque a competência para sofrer a maturação meiótica é adquirida antes da competência para formar embrião viável, sendo que essa última só ocorre na fase final da foliculogênese (Donnison & Pfeffer, 2004).

Existe uma correlação evidente entre o tamanho do folículo e a competência do ovócito (Crozet, 1995; Jee et al., 2009), entretanto esse não é o único fator responsável pela aquisição plena da competência (Hyttel et al., 1997). Essa envolve também a aquisição do correto padrão de metilação (Fagundes et al., 2011) e a formação de estoques de RNA cuja síntese diminui gradativamente à medida que o ovócito atinge seu desenvolvimento máximo.

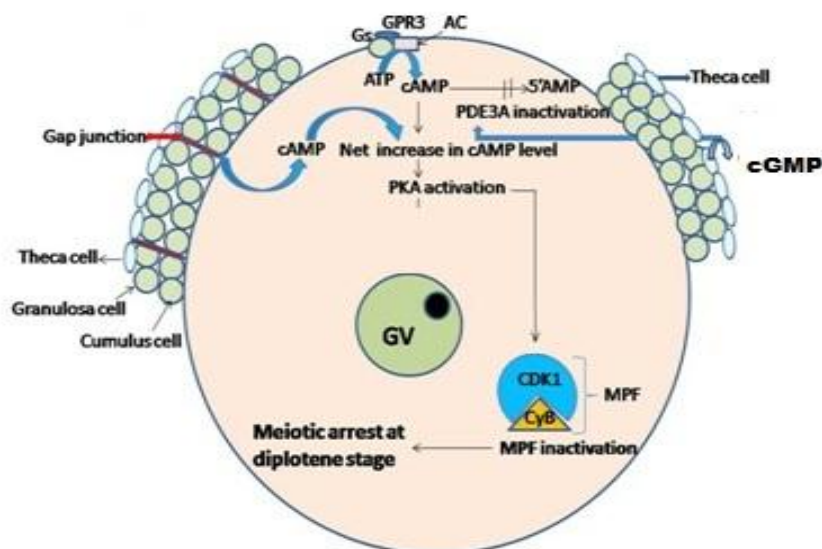
No ovócito, ao contrário do que ocorre com qualquer célula somática, o intervalo entre a síntese e a utilização do RNA pode ser longo, sendo que essas moléculas são armazenadas em uma forma quiescente até o seu uso ao longo da maturação do ovócito e desenvolvimento embrionário inicial (Picton et al., 1998). A eficiência de tal armazenamento, assim como a reativação oportuna das moléculas armazenadas determina a qualidade do ovócito e a sua competência para o desenvolvimento embrionário (Sandri, 2007). Pois, o ovócito quando retoma 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). Portanto, é necessário que ovócito tenha armazenado todos os estoques de RNAs para a condução das primeiras divisões zigóticas e a ativação do genoma embrionário (Brevini Gandolfi & Gandolfi, 2001), que no bovino ocorre entre os estádios de 8 a 16 células (Brevini et al., 2007).

### **2.3- Controle da maturação: Retomada e Retenção da Meiose**

O ovócito depois que cresce precisa ser mantido em VG durante o resto do crescimento folicular e, essa retenção é regulada pela concentração intraovocitária de AMPc (Thiripati et al, 2010). Altas concentrações mantêm a retenção e a redução nos níveis de AMPc, está associada ao reinício da meiose. A concentração de AMPc

intraovocitário é regulada pelo equilíbrio entre a atividade de dois tipos de enzimas: Adenil ciclase (AC) e fosfodiesterase (PDE), que são responsáveis pela síntese e degradação do AMPc, respectivamente (Conti et al., 2002).

O AMPc que mantém a retenção da meiose é produzido pelo ovócito e pelas células foliculares e envolvem vários fatores (Figura 2). O AMPc gerado pelas células da granulosa é transferido para o ovócito através das junções gap, sendo que até recentemente se achava que a transferência contínua das células da granulosa para o ovócito via junções gap era o único responsável por manter a retenção da meiose (Chaube, 2002). No entanto, tem sido demonstrado que a concentração de AMPc intraovocitário, gerado pela atividade da AC, que é estimulada pela ativação de receptores de proteína G estimulatória (GPCRs) presentes na membrana do ovócito (Tripathi et al., 2010; Li et al., 2012), é indispensável para manter a retenção da meiose (Vaccari et al., 2008). Outro fator que também está envolvido no nível de AMPc dentro do ovócito é a guanosina monofostato cíclica (GMPC), oriunda das células da granulosa e da teca. Essa chega através das junções gap ao ovócito e contribui para manter altos os níveis de AMPc, por inibir a ação da PDE 3 e, conseqüentemente, a hidrólise do AMPc (Bilodeau-Goeseels, 2011). Na família de isoenzimas da PDE, existem dois tipos importantes, a PDE3 e PDE4 (Shu et al., 2008; Sasseville et al., 2009). Esses subtipos são diferencialmente localizados, uma vez que a PDE4 está envolvida no metabolismo do AMPc nas células da granulosa e a PDE3 age especificamente no ovócito (Conti et al., 2002; Sasseville et al., 2009, Gilchrist, 2011).



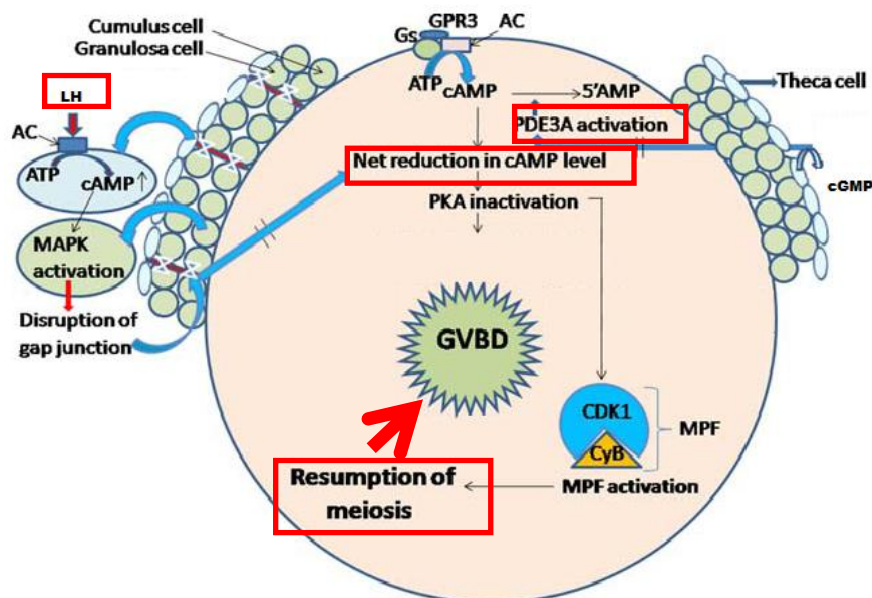
**Figura 2: Esquema representativo do mecanismo de retenção da meiose em ovócito (Adaptado de Tripathi et al., 2010).** O AMPc e GMPc produzido nas células foliculares e do *cumulus* e são transferidos para o ovócito pelas junções gap. O GMPc inativa a PDE3, inibindo a hidrólise do AMPc e a manutenção dos altos níveis de AMPc no ovócito ativa a PKA, mantendo fosforilado os resíduos de tirosina 14 e treonina 15 da subunidade Cdk1 do MPF mantendo-o inativo, dessa forma, retém o ovócito em VG.

A saída do estágio de diplóteno da prófase I ocorre em resposta à estimulação de hormônios gonadotróficos, particularmente LH (Figura 3) ou da retirada abrupta do ovócito do ambiente folicular (revisado por Mehlmann, 2005).

*In vivo*, o LH se liga a seu receptor presente nas células da granulosa e induz a produção de AMPc através da via AC. O aumento do nível de AMPc estimula então a atividade da PKA e, conseqüentemente, a produção de EGF em células da granulosa e do *cumulus* (Norris et al., 2009). Os EGFs produzidos induzirão a atividade da MAPK, que por sua vez interrompe as junções gap entre as células da granulosa, do *cumulus* e ovócito. A interrupção dessa comunicação bloqueia a transferência de AMPc e GMPc (Liang et al., 2007; Tripathi et al., 2010).

A redução do nível de GMPc ativa a PDE3, que reduz ainda mais o nível de AMPc através de hidrólise, que é gerado pelo ovócito via GPR3/AC. A redução do nível de AMPc intraocitário inativa a PKA. A redução da atividade da PKA ativa a Cdc 25 fosfatase, que resulta na desfosforilação da Cdk1 e ativação do MPF. Uma vez

ativo, o MPF finalmente, induz o reinício da meiose (Chaube, 2002; Tripathi et al., 2010) e a expansão das células do *cumulus* (Shimada et al., 2003).



**Figura 3: Esquema representativo do mecanismo da retomada da meiose em ovócito.** Adaptado de Tripathi et al., 2010. O LH se liga a seus receptores presentes nas células da granulosa, que desencadeia uma cascata de fosforilação e desfosforilação, envolvendo o AMPc e GMPc como segundo mensageiros. A ruptura das junções gap reduz a transferência de GMPc para o ovócito, que leva à ativação da PDE3 e a redução dos níveis intraovocitários de AMPc inativa a PKA, tendo como resultado a ativação do complexo Cdk 1 do MPF, tendo como resultado a retomada da meiose.

## 2.4 – Inibição da Meiose

Durante a maturação *in vivo*, ovócitos sofrem diversas modificações a nível molecular e estrutural, que se denomina capacitação, que ocorre para que a maturação seja completa. *In vitro*, a retomada da meiose ocorre de forma abrupta e espontaneamente, independente da competência adquirida. Dessa forma, alguns ovócitos reassumem a meiose sem adquirir plena competência (Adona & Leal, 2006; Gilchrist & Thompson, 2007) e, portanto não são capazes de ter desenvolvimento embrionário normal.

A inibição da retomada da meiose tem sido sugerida como uma estratégia para que os ovócitos disponham de um tempo adicional para sofrerem modificações necessárias para aquisição de competência (Lonergan et al, 2000). Portanto, esse tempo adicional possibilitaria uma melhor sincronização entre os processos de maturação nuclear e citoplasmática, com o objetivo de maximizar a produção de embriões e as demais TRAs (Le Beaux et al, 2003).

A inibição da meiose pode ser induzida pelo uso de inibidores fisiológicos, tais como a presença de hemi-folículos e líquido folicular, ou métodos farmacológicos, como o uso de substâncias que atuam em etapas distintas da via que mantém o MPF inativo. Dentre os métodos farmacológicos pode-se citar o uso de substâncias que mantenham altas concentrações de AMPc no interior do ovócito, como a 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), cilostamida (Bilodeau-Goeseels, 2012; Albuz et al. 2010; Shu et al., 2008); inibidores de síntese proteica de maneira não específica, como a ciclohexemida (Meinecke et al., 2001); inibidores de proteínas quinases, como a dimetilaminopurina (6-DMAP) (Anderiesz et al. 2000; Dode & Adona, 2001); e, ainda, inibidores específicos da fosforilação de proteínas Cdks, como a roscovitina e butirolactona I (Adona & Leal, 2004; Adona & Leal, 2006; Adona et al., 2007; Barretto et al., 2010).

#### **2.4.1- Inibidores fisiológicos**

No intuito de reproduzir um sistema de cultivo *in vitro* que mimetize o ambiente folicular, vários estudos tem avaliado o efeito do uso de fluido folicular (FF), co-cultivo com células da teca e da granulosa e cultivo em hemi folículos, na maturação ovocitária (Oliveira e Silva, 2008).

A utilização de FF no meio de maturação tem por objetivo mimetizar as condições intrafoliculares, pois este é o meio natural em o ovócito fica retido até o estímulo pré-ovulatório; sendo também responsável pela nutrição do ovócito durante a fase de crescimento e contém agentes que inibem a maturação ovocitária (Sirard & Bilodeau, 1990). O efeito do FF sobre a retenção ovocitária irá depender de três fatores: o tamanho do folículo que foi retirado o fluido (Ali et al., 2004), da fase do ciclo estral (Sirard, 1995) e da quantidade de FF utilizado (Ali et al., 2004). Em ovócitos de suínos



e bovinos o FF mostrou-se eficiente em bloquear parcialmente a meiose. O inibidor de maturação do ovócito (OMI) é um fator presente no FF, sendo um dos responsáveis pelo seu efeito inibitório (Sirard et al., 1998).

A utilização das células foliculares e hemi-seções da parede do folículo tenta mimetizar o ambiente folicular durante a maturação *in vitro* com o intuito de entender como ocorre o mecanismo de retomada da meiose, visto que os eventos de retomada espontânea da meiose e luteinização das células da granulosa ocorrem com a retirada do ovócito do ambiente folicular (Richard & Sirard, 1996). Em estudo comparando o cultivo de ovócitos bovinos em folículos antrais intactos ou hemi-seções, mostraram que o grupo cultivado com folículos intactos ficou retido no estágio de VG (96,8%) e, somente 24,6% dos ovócitos cultivados com pequenas hemi-seções conseguiram ficar retidos em estágio de VG. A FIV realizada deste grupo cultivado em folículos resultou em uma alta taxa de produção de blastocisto, comparado com o grupo controle (48,4% vs 32,85,  $p < 0,001$ ) mostrando que é possível melhorar a competência de ovócitos com a retenção da meiose (Fouladi Nashta et al., 1998).

#### 2.4.2- Agentes moduladores do AMPc

Considerando que o AMPc é o responsável por manter a retenção, vários agentes moduladores podem ser utilizados com o intuito de elevar os níveis de AMPc.

O fármaco Forskolin, derivado de uma planta asiática denominada *Colleus paraphoskolii* é um ativador da AC, que aumenta os níveis de AMPc gerado nas células do *cumulus*, transferido para o ovócito através das junções gap, causando a retenção da meiose, pelo aumento dos níveis de AMPc dentro do ovócito. O uso dessa substância inibiu ou pelo menos atenuou a retomada da meiose em ovócitos bovinos (Aktas et al., 1995 e Luciano et al., 2004), murinos (Nogueira et al., 2003), suínos (Bagg et al., 2006) e humanos (Shu et al., 2008), sendo eficaz para a manutenção do ovócito em VG por 24 horas sem afetar o desenvolvimento embrionário.

Outro agente modulador do AMPc que é utilizado para o incremento dos níveis de AMPc é a Adenil ciclase invasiva (AC<sub>i</sub>), que é uma toxina produzida pela *Bordetella pertussis* que é incorporada pelas células de mamíferos e aumenta a produção de segundo mensageiro AMPc (Luciano et al., 1999). A AC<sub>i</sub> é capaz de reter a meiose de

ovócitos bovinos, com reversibilidade da retenção e alcançando o desenvolvimento da competência, tendo cerca de 80% dos ovócitos em MII após 24 horas de cultivo (Aktas et al., 1995). Também foi verificado que o uso da  $AC_i$  é capaz de elevar os níveis de AMPc tanto em COCs como em ovócitos desnudos, (Aktas et al., 2003) e que seu uso melhora as taxas de clivagem e de desenvolvimento até o estágio de blastocisto na espécie suína e bovina (Funahashi et al., 1998; Luciano et al., 2004).

Estudos utilizando ovócitos bovinos (Thomas et al., 2004; Albus et al., 2010, Luciano et al., 2011), camundongos (Nogueira et al., 2003; Nogueira et al., 2004, Li et al., 2012), ovinos (Rose et al., 2012) e humanos (Shu et al., 2008) tem mostrado que a maturação do ovócito é diferencialmente regulada pela isoenzima específica fosfodiesterase (PDE), que é responsável por degradar o AMPc do ovócito (Thomas et al., 2004). A fosfodiesterase do tipo 3 (PDE 3) é responsável pela hidrólise do AMPc intravaocitário, enquanto que fosfodiesterase do tipo 4 (PDE 4) hidrolisa o AMPc gerado das células da granulosa e do *cumulus* (Yeo et al., 2009). Portanto, o AMPc pode ter seus níveis elevados por expor os ovócitos a substâncias inibidoras da PDE, não específicas, como o IBMX, ou específicas, como a cilostamida ou milirone (PDE3) ou o rolipram (PDE4) (Gilchrist & Thompson, 2007).

O IBMX, receptor não específico da PDE, previne a degradação de AMPc, retendo a meiose de forma transitória (Sirard & First, 1988). Esse efeito transitório pode ser observado em COCs bovinos cultivados com IBMX por 8 horas, entretanto, esse efeito não é mais perceptível às 24 horas de cultivo (Bilodeau et al., 1993), indicando que inibidores de amplo espectro de PDE como IBMX, só podem ser utilizados por período curto de tempo.

Por outro lado, inibidores específicos da PDE-3 como o milrinone e da PDE-4 como o rolipram, preveniram a degradação do AMPc em ovócitos bovinos, resultando em seu acúmulo nas células do *cumulus* e no ovócito, mantendo estáveis as junções gap e atrasando a retomada da meiose (Thomas et al., 2002).

Com o intuito de caracterizar o efeito dos inibidores da PDE em ovócitos bovinos, Thomas et al., (2004) observaram que, a utilização da milrinone concomitante com FSH mostrou atrasar o início da VGBD em até quatro horas se comparado com o controle. Nesse estudo também foi observado uma maior taxa de blastocisto (52%) no grupo tratado do que no grupo controle, (38%) (Thomas et al., 2004).

Em humanos, a retenção meiótica utilizando-se a cilostamida, um inibidor da PDE-3 em combinação com o forskolin, influenciou positivamente, a qualidade do

ovócito observada pelo efeito sinérgico na prevenção da perda das junções gap e na retomada da meiose (Shu et al., 2008). Da mesma forma, o uso de cilostamida em ovócitos de camundongos (Nogueira et al., 2003) reteve 99% em estágio de VG e ainda no mesmo modelo animal, Vanhoutte et al. (2007) mostrou que mais de 80% de ovócitos cultivados na presença de cilostamida nas concentrações de 1 e 10  $\mu\text{M}$  mantiveram-se em estágio de VG.

Em relação à comunicação bidirecional existente entre ovócito e células do *cumulus*, Shu et al. (2008) demonstraram que o uso de 20  $\mu\text{M}$  de cilostamida associada a 50  $\mu\text{M}$  de forskolin, a retomada da meiose foi atenuada em 35,6% durante a pré-maturação de ovócitos humanos (35,6% dos pré-maturados vs. 19,9% controle), demonstrando o efeito positivo de agentes moduladores do AMPc. Em bovinos essa comunicação também tem um papel fundamental na manutenção dos níveis de AMPc intraovocitário (Luciano et al. 2004; Thomas et al., 2004; Luciano et al. 2011) e por essa razão assume que esse prolongamento da comunicação do ovócito e células do *cumulus* após o tratamento com agentes como a cilostamida ou forskolin pode ser atribuído ao acúmulo de AMPc (Thomas et al. 2004 Shu et al., 2008).

#### **2.4.4- Inibidores da atividade de proteínas quinases**

Sabe-se que ativação do complexo MPF é um ponto crucial na retomada da meiose em ovócitos bovinos. Essa ativação envolve a formação de um complexo entre a subunidade da catalítica (p34 cdc2 ou Cdk1) e uma subunidade regulatória (ciclina B1). Uma vez formado, esse complexo pode ser ativado pela desfosforilação dos resíduos da treonina 14 e tirosina 15 da subunidade catalítica Cdk1 (Mermillod, 2000), além de síntese proteica (Lonergan, 1997). Entretanto, a ativação do complexo MPF e a retomada da meiose pode ser prevenida pelo uso de substâncias que atuem diretamente em algum ponto desse processo, seja na fosforilação, seja na síntese de proteína (Bilodeau-Goeseels, 2011). Substâncias tais como a butirolactona-I, a roscovitina e a bohemina (Adona, 2002; Adona & Leal, 2004; Adona, 2006), agindo de forma a inibir seletivamente as quinases Cdk2 e Cdk1, que possuem um papel fundamental na progressão do ciclo celular nas fases G1/S e G2/M, respectivamente (Mc Laughlin & Mc Iver, 2009), podem ser utilizadas para bloquear a meiose.

Derivados de purinas que inibe especificamente o MPF por inibirem a p34 cdc2 são frequentemente utilizados em ovócitos bovinos, tais como a roscovitina e a butirolactona I. Ambos os inibidores mantém uma alta proporção de ovócitos em VG por um período de 24 horas ou mais (Adona, 2006; Barreto, 2008; Gottardi, 2009). Na maioria dos estudos relacionados com inibidores do MPF, a taxa de clivagem é relativamente alta, enquanto que a taxa de blastocistos é similar ou inferior ao grupo controle. Adona (2002) obteve uma taxa de 77-80% de clivagem de ovócitos submetidos à pré-maturação com boehmina, roscovitina e butirolactona-I, no entanto as taxas de blastocistos foram inferiores (20,3%; 24,4%; 32,1%, respectivamente) em relação ao controle 24 horas (34,8%) e o controle 18 horas (43,1%), que corrobora com resultados encontrados por Lonergan et al.,(2000), que utilizou a butirolactona-I e Mermillod et al.,(2000), que utilizou a roscovitina.

Entretanto, Barreto et al.,(2010) utilizando a roscovitina durante o período de pré-maturação por 8 horas, seguido de maturação *in vitro* por 16, 20 e 24 horas, observaram que a clivagem foi semelhante para todos os grupos, porém o desenvolvimento embrionário foi maior nos grupos tratados com inibidor, independente do período de maturação, em relação ao grupo controle. Essa divergência nos resultados pode ser devido ao período de exposição dos ovócitos a estes inibidores ou a concentração utilizada, fatores que podem ter efeito contrário e ser prejudicial ao desenvolvimento embrionário.

## **2.5- Métodos alternativos utilizando inibidores da meiose**

Apesar de inúmeras tentativas do uso de inibidores da meiose em ovócitos bovinos e posteriormente submetidos à MIV, poucos resultados apresentaram um incremento nas taxas de blastocistos. Alternativas com o intuito de melhorar a qualidade de ovócitos utilizados nas TRAs, foram apresentadas como a modificação da MIV utilizando a cultura bifásica onde ao invés da utilização de inibidores farmacológicos durante o passo inicial, um meio que não promove a maturação nuclear é utilizado (Oliveira & Silva, 2011), entretanto o desenvolvimento embrionário não foi avaliado em um estudo posterior.

Com base nos conhecimentos sobre o papel do AMPc e da PDE na maturação, Albuz et al., (2010), mostraram que é possível simular o que ocorre *in vivo*, utilizando substâncias químicas. Esse sistema chamado de SPOM (do inglês, *simulated physiological oocyte maturation*) inclui um curto período de pré-MIV (1-2 h) utilizando os inibidores da meiose Forskolin (ativador da AC) e IBMX (inibidor não específico da PDE) de forma a gerar um rápido aumento nos níveis de AMPc tanto nas células do *cumulus* como no ovócito, como ocorre nos COCs imediatamente após o pico pré-ovulatório de gonadotrofina.

Essa pré- MIV também tem o efeito de prevenir a perda imediata da comunicação do ovócito e células do *cumulus* através das junções gap de ovócitos aspirados do ambiente folicular, de forma a atrasar a retomada espontânea da meiose. Foi demonstrado que, utilizando ativadores da AC, acrescido com inibidores da PDE não específico, a maioria dos ovócitos retardou a VGBD ao mesmo tempo em que estendeu a duração das junções gap e entre ovócitos e células do *cumulus* durante a fase da retomada da meiose (Albuz et al., 2010).

A fase da MIV estendida (30 horas) foi delineada para atenuar a retomada da meiose que é induzida pelo FSH. Uma característica importante desse sistema de MIV é que os ovócitos são continuamente expostos durante a maturação a moderadas doses de inibidores da PDE do tipo 3 (cilostamida), que é uma enzima expressa no ovócito, que no caso é o alvo para esta abordagem. Nessa etapa, uma concentração relativamente alta de FSH ( $100\text{mUI/ml}^{-1}$ ) é crucial para induzir a maturação do ovócito na presença de cilostamida. Essa abordagem foi utilizada com sucesso em bovinos e em camundongos (Albuz et al., 2010).

Dessa forma o SPOM mimetiza os sinais moleculares que ocorrem durante a maturação *in vivo* e representa uma alternativa para o aumento da eficiência da MIV e da PIVE de animais domésticos.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADONA, P. R. **Efeito de diferentes inibidores específicos do fator promotor da maturação (MPF) na retenção da meiose em ovócitos bovinos in vitro.** Rio de Janeiro: Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2002, 68p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)- Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade do Norte Fluminense, 2002.

ADONA, P.R.; LEAL, C.L.V. Meiotic inhibition with different cyclin dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. **Zygote**, v. 12, p. 197-204, 2004.

ADONA, P. R. **Efeitos morfológicos, bioquímicos e moleculares do bloqueio meiótico em ovócitos bovinos sobre a produção in vitro de embriões.** Rio de Janeiro: Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2006, 78p. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias)- Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade do Norte Fluminense, 2006.

ADONA, P.R.; LEAL, C.L.V. Effect of concentration and exposure period to butyrolactone I on meiosis progression in bovine oocytes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 354-359, 2006.

ADONA, P. R.; PIRES, P. R.; QUETGLAS, M. D.; SCHWARZ, K. R.; LEAL, C. L. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: effects on meiosis progression,

cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Animal Reproduction Science**, v. 108, p. 49-65, 2008.

ADONA, P. R.; DE BEM, T.H.C.; MESQUITA, G.L.; ROCHETTI, R.C.; LEAL, C.L.V. Embryonic development and gene expression in oocytes cultured in vitro in supplemented pre-maturation and maturation media. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 31-38, 2011.

ALBUZ, F. K.; SASSEVILLE, M.; LANE, M.; ARMSTRONG, D. T.; THOMPSON, J. G. GILCHRIST, R. B. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction**, v. 25, p. 2999-3011, 2010.

ALI, A.; COENEN, K.; BOUSQUET D.; SIRARD, M.A. Origin of bovine follicular fluid and its effects during in vitro maturation on the developmental competence of oocyte bovine. **Theriogenology**, v. 92, p. 1596-1606, 2004.

ANGUITA, B.; PARAMIO, M.T.; JIMENEZ-MACEDO, A.R.; MORATÓ, R.; MOGAS, T.; IZQUIERDO, D. Total RNA and protein content, Cyclin B1 expression and developmental competence of prepubertal goat oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 103, p. 290-303, 2008.

AKTAS, H.; WHELLER, M.B.; FIRST, N.L.; LIEBFRIED, M.L. Maintenance of meiotic arrest by increasing [cAMP] may have physiological relevance in bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 105, p. 237-245, 1995.

ANDRIESZ, C.; FONG, C.Y.; BONGSO, A.; TROUNSON, A.O. Regulation of human and mouse oocyte maturation in vitro with 6- dimetylamino purine. **Human Reproduction**, v. 15, p. 379-388, 2000.

ARRIS, C.E.; BOYLE, F.T.; CALVERT, A.H.; CURTIN, N.J.; ENDICOTT, J.A.; GARMAN, E.F.; GIBSON, A.E., et al. Identification of novel purine and pyrimidine cyclin-dependent kinase inhibitors with distinct molecular interactions and tumor cell

growth inhibition profiles. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 2797-2804, 2000.

BAGG, M.A.; NOTTLE, M.B.; GRUPEN, C.G.; ARMSTRONG, D.T. Effect of dibutryl cAMP on the cAMP component, meiotic progression and developmental potential of in vitro matured pre-pubertal and adult pigs. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 1326-1332, 2006.

BARRETO, L.S.S. **Avaliação dos efeitos da inibição da maturação nuclear e de antioxidantes sobre a maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário**. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, 2008. 74p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, 2008.

BARRETO, L.S.S.; CASTRO, V.S.D.C.; GARCIA, J.M.; MINGOTI, G.Z. Meiotic inhibition of oocytes bovines in medium supplemented with a serum replacer and hormones: effects on developmental capacity. **Zygote**, v. 19, p. 107-116, 2010.

BESSA, I.R. **Perfil da expressão de genes candidatos para a aquisição da competência durante o crescimento ovocitário em bovinos**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2011. 71p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2011.

BILODEAU, S.; FORTIER, M.A.; SIRARD, M.A. Effect of adenylate cyclase stimulation on meiotic resumption and cyclic AMP content of zona-free and *cumulus*-enclosed bovine oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 5-11, 1993.

BILODEAU- GOESEELS, S. Cows are not Mice; the role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**. DOI: 10.1002/mrd.21337, 2011.



BILODEAU- GOESEELS, S. Bovine oocyte meiotic inhibition before *in vitro* maturation and its value to *in vitro* embryo production: does it improve developmental competence? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 687-693, 2012

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.

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

BREVINI, T.A.L.; CILLO, F.; ANTONINI, S.; GANDOLFI, F. Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 23–38, 2007.

CAIXETA E.S. **Expressão de genes candidatos para aquisição da competência ovocitária em bovinos**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2009. 53 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2009.

CHAUBE, S.K. Does cAMP act as regulator for oocyte meiotic resumption in mammal? **Journal of Cellular Physiology**, v. 24, p. 74-85, 2002.

CHESNEL, F.; EPPIG, J.J. Syntesis and accumulation of p34cdc2 and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. **Molecular Reproduction Development**, v. 40, p.503-508, 1995.

CONTI M.; ANDERSEN C.B.; RICHARD F.; MEHATS C.; CHUN S.Y.;HORNER, K. et al. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, p. 153–159, 2002.

CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; DUBOS, M.P. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, p. 293-298, 1995.

DE LA FUENTE, R.; O'BRIEN, M.J.; EPPIG, J.J. Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. **Human Reproduction**, v. 14, p. 3060–3068, 1999.

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. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, p. 19-25, 2005.

DIAZ, F.J.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J.J. Oocytes determine *cumulus* cell lineage in mouse ovarian follicles. **Journal of Cell Science**, v. 120, 1330-1340, 2007.

DIELEMAN, S.J.; HENDRIKSEN, P.J.M.; VIUFF, D.; THOMSEN, P.D. et al. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v. 57, p. 5-20, 2002.

DODE, M.A.N.; ADONA, P.R. Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6- dimethylalaminopurine. **Animal Reproduction Science**. v. 65, p. 171-180, 2001.

DONNISON, M.; PFEFFER, P.L. Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantification of their levels during development. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 23-32, 2004.

DRAGOVIC, R.A.; RITTER, L.J.; SCHULTZ, S.J.; AMATO, F.; ARMSTRONG, D.T.; GILCHRIST, R.B. Secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse *cumulus* cell expansion. **Biology of Reproduction**, v. 76, p. 848-857, 2007.

EPPIG, J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, p. 829-838, 2001

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, p. 437-442, 1995.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. Bovine. **Molecular Reproduction and Development**, v. 43, p. 503-512, 1996

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence, **Animal Reproduction Science**, v. 78, p.203-216, 2003.

FISSORE, R.A.; HE, C.L.; VANDE HOUDE, G.F. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1261-1270, 1996.

FOULADI NASHTA, A.A.; WADDINGTON, D.; CAMPBELL, K.H.S. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development in vitro: a comparative evaluation of antral follicle culture with other methods. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 255-262, 1998

FUNAHASHI, H.; CANTLEY, T.C.; DAY, B.N. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following in vitro fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 57-49, 1997.

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 431-46, 2004.

GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, v. 67, p. 6-15, 2007.

GILCHRIST, R.B.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of *cumulus* cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v. 14, p. 159-177, 2008.

GILCHRIST, R.B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to *in vitro* maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p. 23-31, 2011.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; KOT, K; MEIRA, C.; BERGFELT, D.F. Associated and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 524-529, 2003.

GORDON, A.C.; HE, C. L.; SMITH, S.; FISSORE, R. A. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 59, p. 106-14, 2001.

GOTARDI, F.P. **Inibição da maturação nuclear pela butirolactona I durante o transporte de oócitos bovinos destinados à produção *in vitro* de embriões (PIV)**. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, 2009. 74p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, 2009.

GOTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência para aquisição de competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, p. 82-94, 2009.

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

JEE, B.; CHEN, H.Y.; CHENG, R.; CHIAN, R.C. Effect of a phosphodiesterase type 3 inhibitor in oocyte maturation medium on subsequent mouse embryo development. **Fertility and Sterility**, v. 91, p. 2037-2042, 2009.

KACINSKIS M. A.; LUCCI C.M.; LUQUE M.C.A, BÁO S.N. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.87, p.45-57, 2005.

KANAYAMA, N.; MIYANO, T.; LEE, J. Acquisition of meiotic competence in growing pig oocytes correlates with their ability to activate Cdc2 Kinase and MAP kinase. **Zygote**, v. 10, p. 261-270, 2002.

KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R.M.; PAVLOK, A. Butyrolactone-I reversibility inhibits 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.

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

LIANG, C.G.; SU, Y.Q.; FAN, H.Y.; SCHATTEN, H.; SUN, Q.Y. Mechanisms Regulating oocyte meiotic resumption: Roles of mitogen-activated protein kinase. **Molecular Endocrinology**, v. 21, p. 2037-2055, 2007.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; CAROLAN, C.; MERMILLOD, P. Bovine blastocyst production in vitro after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, p. 355-365, 1997.

LONERGAN, P. DINNYES, A.; FAIR, T.; YANG, X.; BOLAND, M. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butirolactone-I. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, p. 204-209, 2000.

LUCCI C.M.; RUMPF R; FIGUEIREDO JR, BÁO S.N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, v.15 p.1467-1483, 2002.

LUCIANO, A.; POCAR, P.; MILANESI, E.; MODINA, S.; RIEGER, D.; LAURIA, A.; GANDOLFI, F. Effect of different levels of intracellular cAMP on the in vitro maturation of cattle oocytes and their subsequent development following in vitro fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v. 54, p. 86-91, 1999.

LUCIANO, A.; MODINA, S.; VASSENA, R.; MILANESI, E.; LAURIA, A.; GANDOLFI, F. Role of intracellular cyclic adenosine 3',5' monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during in vitro maturation of bovines. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 465-472, 2004.

LUCIANO, A.; FRANCIOSI, F.; MODINA, S. C.; LODDE, V. Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP dependent mechanism(s). **Biology of Reproduction**, v. 85, p. 1252-1259, 2011.

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.

MARTINS, F.S.; VIANA, J.R.S.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 36-49, 2008.

MAYES, M.A.; SIRARD, M.A. Effect of type 3 and type 4 phosphodiesterase inhibitors on the maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest. **Biology of Reproduction**, v. 66, p.180–184, 2002.

MEINECKE, B.; JANAS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocyte following protein synthesis inhibition. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 183-188, 2002.

MEHLMANN, L.M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, v. 130, p. 791-799, 2005.

Mc LAUGHLIN, E.A.; Mc IVER, S. Awakenig the oocyte: controlling primordial follicle development. **Reproduction**, v. 137, p. 1-11, 2009.

Mc NATHY, K.P.; MOORE, L.G.; HUDSON, N.L.; QUIRKE, L.D.; LAWRENCE, S.B. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. **Reproduction**, v. 128, p. 379-386, 2006.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibitor of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction**, v. 55, p. 89-95, 2000.

MINGOTI, G.Z. **Maturação oocitária associada à esteroidogênese. Papel do soro sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteróides.** São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de São Paulo, 2000. 135p. Dissertação (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de São Paulo, 2000.

MIYANO, T. Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. **Theriogenology**, v. 59, p. 61-72, 2003.

NOGUEIRA, D.; CORTVRINDT, R.; DE MATOS, D.G.; VANHOUTTE, L.; SMITZ, J. Effect of phosphodiesterase type 3 on developmental competence of immature mouse oocyte in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 2045-2052, 2003.

NOGUEIRA D.; ALBANO, C.; ADRIAENSSENS, T.; CORTVRINDT, R.; BOURGAIN, C.; DEVROEY, P.; SMITZ, J. Human oocytes reversibly arrested in prophase I by phosphodiesterase type 3 inhibitor in vitro. **Biology of Reproduction**. v. 69, p. 587-592, 2004.

NOGUEIRA, D. RON-EL, R.; FRIEDLER, S.; SCHACHTER, M.; RAZIEL, A.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. Meiotic arrest by phosphodiesterase type 3 enhances maturatt in vitro capacity of human oocytes and allow subsequent embryonic development. **Biology of Reproduction**. v. 74, p. 177-184, 2006.

NORRIS, R.P.; RATZAN, W.J.; FREUDZON, M.; MEHLMANN, L.M.; KRALL, J.; MOVSESIAN, M.A.; WANG, H.; KE, H.; NIKOLAEV, V.O. JAFFE, L.A. Cyclic GMP from the surrounding cells regulatmates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development**. 136, 1869-1878, 2009.

OLIVEIRA E SILVA, I. **Inibição e reversão da maturação nuclear, avaliação da maturação citoplasmática e produção de esteróides em complexos *cumulus-oophorus* bovinos co-cultivados com hemi-seções foliculares em meio de cultivo definido**. Brasília: Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, 2008. 84p. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, 2008.

OLIVEIRA E SILVA, I.; VASCONCELOS, R.B.; CAETANO, J.V.O.; GOULART, L.V.M.; CAMARGO, L.S.A.; BÁO, S.N.; ROSA E SILVA, A.A. Induction of reversible meiosis arrest of bovine oocytes using a two step procedure under defined and non-defined conditions. **Theriogenology**, v. 75, p. 1115-1124, 2011.

PAVLOK, A. D-penicillamine and granulosa cells can effectively extend the fertile life span of bovine frozen thawed spermatozoa in vitro: effect on fertilization and polysermy. **Theriogenology**, v. 55, p.1135-1146, 2000.



PICTON, H.M.; HARRIS, S.E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E.L. The *in vitro* growth and maturation of follicles. **Reproduction**, v. 136, p. 703–715, 2008.

PONTES J.H.F.; NONATO-JUNIOR I.; SANCHEZ B.V.; ERENO-JUNIOR J.C.; UVO S.; BARREIROS T.R.R.; OLIVEIRA J.A.; HASLER J.F.; SENEDA M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, p.690-697, 2009.

PONTES, J.H.F.; MELO-STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES, B.V.; RUBNIC, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, p. 1640-1646, 2011.

QUETGLAS, M. D. **Efeito do bloqueio meiótico na expressão, atividade e distribuição do fator promotor da meiose (MPF) e da proteína cinase ativada por mitose (MAPK) em oócitos bovinos.** Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2007. 90p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2007.

RICHARD, F.; SIRARD, M.A. Effects of follicular cells on oocyte maturation: effects of follicular hemisections on bovine maturation. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 16-21, 1996.

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

RODRIGUEZ, F. K.; FARIN, E. C. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 55-67, 2004.

ROSE, R.D.; GILCHRIST, R.B.; KELLY, J.M.; THOMPSON, J.G.; SUTTON MCDOWALL, M.L. Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators, **Theriogenology**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.09.020>, 2012.

SASSEVILLE, M.; ALBUZ, F.K.; CÔTÉ, N.; GUILLEMETTE, C.; GILCHRIST, R.B.; RICHARDS, F. Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 415-425, 2009.

SÀNCHEZ, F.; SIMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, DOI: 10.1016/j.bbadis.2012.05.013, 2012.

SANDRI, L.R. **Efeito de bloqueadores meióticos na maturação e ultra-estrutura de oócitos e sua consequência na produção de embriões in vitro**. Santa Maria: Faculdade de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, 2007. 57p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

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

SIRARD, M.A.; BILODEAU, S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 777-783, 1990.

SIRARD, M.A.; ROY, F.; MERMILLOD, P.; GUILBALT, L.A. The origin of follicular fluid added to the media during bovine IVM influences embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, p. 85-94, 1995.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v. 49, p. 483-497, 1998.

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

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**. v. 65, p. 126-36, 2006.

SHIMADA, M.; NISHIBORI, M.; ISOBE, N.; KAWANO, N.; TERADA, T. Luteinizing hormone receptor formation in cumulus cells surrounding porcine oocytes and its role during meiotic maturation of porcine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 484-491, 2003.

SHU, Y. M.; ZENG, H. T.; REN, Z.; ZHUANG, G. L.; LIANG, X. Y.; SHEN, H. W.; YAO, S. Z.; KE, P. Q.; WANG, N. N. Effects of cilostamide and forskolin on the meiotic resumption and embryonic development of immature human oocytes. **Human Reproduction**, v. 23, p. 504-513, 2008.

TRIPATHI, A.; KUMAR, K. V.; CHAUBE, S. K. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. **Journal of Cellular Physiology**, v. 223, p. 592-600, 2010.

THOMAS, R. E.; THOMPSON, J.; ARMSTRONG, C. G.; GILCHRIST, R. B. Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during in vitro maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1142-1149, 2002.

THOMAS, R. E.; THOMPSON, J.; ARMSTRONG, C. G.; GILCHRIST, R. B. Bovine *cumulus*-cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response of cell-specific cyclic adenosine 3', 5'- monophosphate cyclic levels. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 548-556, 2004.

THOMPSON, J.G.; GARDNER, D.K.; PUGH, P.A.; McMILAN, W.H.; TERVIT, H.R. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. **Biology of Reproduction**. v. 53, p. 1385-1391, 1995.

TSAFRIRI, A.; CHUN, S.Y.; ZHANG, R.; HSUEH, A.J.; CONTI, M. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. **Development Biology**. v. 178, p. 393-402, 1996.

VACCARI, S.; HORNER, K.; MEHLMANN, L.M.; CONTI, M. Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: Endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest. **Developmental Biology**, v. 318, p. 124-134, 2008.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**. v. 63, p. 1717-51, 2005.

VANHOUTTE, L.; NOGUEIRA, D.; GERRIS, J. DHONT, M.; DE SUTTER, P. Effect of Temporary Nuclear Arrest by Phosphodiesterase 3-Inhibitor on Morphological and Functional Aspects of In Vitro Matured Mouse Oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 1021–1030, 2008.

YEO, C.; GILCHRIST, R.B.; LANE, M. Disruption of bidirectional oocyte-*cumulus* paracrine signaling during in vitro maturation reduces subsequent mouse oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 1072-1080, 2009.

WEHREND, A.; MEINEKE, B. The meiotic cell cycle in domestic animals. **Reproduction Science**, v. 33, p. 289-297, 1998.

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

ZHANG, M.; OUYANG, H.; XIA, G. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, p. 399-409, 2009.

## **CAPITULO 2**

## 1 RESUMO

O sucesso da utilização da maioria das técnicas de reprodução assistida (TRA) depende da disponibilidade de ovócitos saudáveis e do estágio adequado para seu uso. Como um dos fatores limitantes na utilização das TRAs é a disponibilidade de ovócitos competentes, é importante buscar alternativas para auxiliar esses ovócitos, melhorando com isso a eficiência dessas técnicas. O objetivo deste trabalho foi testar dois diferentes sistemas de maturação, o sistema SPOM (*simulated physiological oocyte maturation*) e a retenção meiótica na presença de ITS, (Insulina-transferrina-selênio) para aumentar a competência do ovócito e conseqüentemente incrementar a produção de embriões *in vitro*. Os ovócitos foram obtidos de ovários de abatedouro, sendo que os provenientes de folículos de 1-3 mm foram dissecados da córtex ovariana e os de 3-8 mm, obtidos por punção folicular. Para a avaliação dos estágios de maturação nuclear, os ovócitos foram corados com lacmóide e para verificar do efeito dos sistemas de MIV na produção de embriões, foi avaliada a taxa de clivagem, blastocisto, tamanho dos embriões e número total de células. O corante azul de Trypan foi utilizado para verificar a viabilidade das células do *cumulus* após a retenção. Os dados de taxa de maturação nuclear e desenvolvimento embrionário foram avaliados pelo teste do Qui-quadrado, e os dados referentes a tamanho e número de células pelo teste de Kruskal-Wallis. Foi testado o sistema SPOM em ovócitos de folículos aspirados, com a dose 0,01 UI/ml de FSH, utilizada na MIV convencional, onde as taxas de clivagem, D7 e D8 foram drasticamente reduzidas ( $P < 0,05$ ) quando comparadas com as do grupo controle. O aumento da dose de FSH para 0,1 UI/ml, no sistema SPOM, em ovócitos obtidos de folículos de 1-3 mm não aumentou a produção de embriões ( $P < 0,05$ ), entretanto em ovócitos obtidos de folículos de 3-8 mm tiveram suas taxas de clivagem e blastocistos

inferiores ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. Da mesma forma, quando o SPOM foi utilizado na presença de FSH recombinante, de BSA como suplemento dos meios e o cultivo realizado sob baixa tensão de  $O_2$ , uma redução ( $P < 0,05$ ) na taxa de blastocisto foi observada, mas o tamanho e número de células dos embriões foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) aos do controle. A segunda alternativa testada foi o uso da cilostamida, inibidor da PDE3, e ITS no cultivo de pré-maturação por 8 e 24 horas. Na concentração de  $20\mu M$ , a cilostamida reteve 91% dos ovócitos em VG por até 24 horas, entretanto o desenvolvimento embrionário destes embriões foi comprometido, com baixas taxas de clivagem e de embriões em D7 ( $P < 0,05$ ). Foi também avaliada a diminuição da concentração de cilostamida durante o bloqueio e a presença do ITS. Foi observado que a redução da concentração de cilostamida associada ao período menor de retenção causou um aumento da produção de blastocisto semelhante às taxas obtidas para o controle e que o ITS não afetou ( $P > 0,05$ ) a resposta dos ovócitos a retenção com cilostamida. Conclui-se que o sistema SPOM utilizando FSHr, BSA e baixa tensão de  $O_2$  afetou o desenvolvimento embrionário. Além disso, a cilostamida quando utilizada para bloquear a meiose tem efeito deletério nos ovócitos e células do *cumulus* se utilizada por 24 horas na concentração de  $20\mu M$ . A menor concentração ( $10\mu M$ ) e menor tempo de exposição (8 horas) pode amenizar esse efeito, mas também não causa nenhum incremento na produção de embriões. A presença de ITS durante o bloqueio não afeta a produção de embriões. Mais estudos devem ser realizados na tentativa de utilizar a retenção para incrementar a qualidade de ovócitos utilizados para as TRAs

Palavras-Chave: Cilostamida, cultivo de pré-maturação, SPOM, retenção meiótica.

## 2 ABSTRACT

The successful use of most assisted reproductive techniques (ART) depends on the availability of healthy and competent oocytes. Considering that one of the limiting factors for using ART's is the availability of good quality oocytes, it is important to find new alternatives which could help those oocytes and then improving the efficiency of these biotechnology. The aim of this study was to test two different maturation systems, the SPOM (simulated physiological oocyte maturation) methodology and the meiotic inhibition in the presence of ITS (Insulin-transferrin-selenium), to improve oocyte competence and consequently, the in vitro embryos production. Oocytes were obtained from slaughter house ovaries, being those from follicles from 3-8 mm diameter were obtained by aspiration and those from 1-3mm follicles by dissection. To evaluate maturational stage oocytes were stained with lacmoid, and to verify the effect of maturation system on in vitro embryos production cleavage rate, blastocyst at D7 and D8 rates, embryo size and total cell number were used. The trypan blue stain was used to evaluate cumulus cells viability after meiotic inhibition. Data of nuclear maturation and embryo development were evaluated by the Chi Square test and those of embryo size and total cell number by Kruskal-Wallis test. At first SPOM system was tested in aspirated oocytes, with 0.01 IU/ml of FSH, used in conventional IVM, where rates of cleavage, D7 and D8 were drastically reduced compared to control ( $P < 0.05$ ). Increasing the dose of FSH to 0.1 IU/ml in the SPOM system did not affect ( $P > 0.05$ ) the results and embryos production remained low. When oocytes from follicles of 1-3 mm were used, although the embryo rate was low for both group, no effect of SPOM system was observed. However, when recombinant FSH (FSHr) was associated with BSA instead of FCS and culture was performed under low oxygen a



reduction ( $P<0.05$ ) on blastocyst rates were observed, but the size and total cell number were similar to the control ( $P>0.05$ ). The second alternative to be tested was the use of cilostamide, an inhibitor of PDE3A, associated with ITS on pre-maturation culture for 8 and 24 h. Cilostamide concentration of  $20\mu\text{M}$  retained 91% of oocytes in GV for 24 hours, however, embryonic development and quality of these embryos were compromised presented lower cleavage and blastocyst rates than the control ( $P<0.05$ ). Decreasing cilostamide concentration and the presence of ITS associated with lower period of meiotic inhibition was also evaluated. It was observed that lower concentration ( $10\mu\text{M}$ ) during less time of inhibition (8h) caused an increase in embryo production being the rates similar to the control (40.7% vs 51.8%) and that ITS had no effect ( $P>0.05$ ) oocyte response to cilostamide inhibition. It can be concluded that SPOM using FSHr, BSA and low  $\text{O}_2$  tension does not affect embryo development. In addition, cilostamide had a deleterious effect in oocytes and cumulus cells when used for 24 h at  $20\mu\text{M}$  concentration to inhibit meiosis. Lower concentration ( $10\mu\text{M}$ ) with less time of exposure (8 hours) eliminated the deleterious effect but did not increase embryo production. More studies are needed to establish the use of meiotic inhibition associated with other substances to improve oocyte quality to be use on ART's.

Keywords: Cilostamide, pre-maturation culture, SPOM, meiotic arrest.

### 3 INTRODUÇÃO

Nas técnicas de reprodução assistida os ovócitos utilizados para a maturação *in vitro* (MIV) são obtidos de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento e, portanto, constituem uma população heterogênea com diferentes graus de competência (Jee et al., 2009). Quando esses ovócitos são retirados do ambiente folicular, automaticamente retomam a meiose e, aqueles que não atingiram a competência, ou seja, ainda não completaram a maquinaria citoplasmática para suportar o desenvolvimento (Gilchrist & Thompson, 2007), não serão capazes de se tornar embriões viáveis. Esse é um dos principais fatores responsável pela produção limitada de embriões quando se utiliza a PIVE e demais biotécnicas, cujo sucesso depende da disponibilidade de ovócitos competentes.

Estudos têm mostrado que a competência é adquirida antes da maturação (Blondin et al., 1997), e que é possível influenciar o potencial de desenvolvimento alterando o sistema de MIV (Abuz et al., 2010; Luciano et al., 2011). Os ovócitos retirados prematuramente dos folículos retomam a meiose espontaneamente por mecanismos diferentes dos que os que ocorrem na retomada da meiose *in vivo*. Portanto, uma das alternativas para aumentar a competência dos ovócitos seria tentar simular *in vitro* os eventos que ocorrem *in vivo* durante a retomada da meiose induzida pelo estímulo do LH pré-ovulatório.

Estudos acerca dos mecanismos de retenção e retomada da meiose mostraram que altos níveis de AMPc, sintetizado pelos ovócitos e pelas células do *cumulus*, mantém os ovócitos meioticamente retidos (Tripathi et al., 2010). Quando o LH atinge o folículo, induz um aumento nos níveis de AMPc nas células da granulosa e uma diminuição dentro do ovócito, assim induzindo a retomada da meiose, bem como a expansão das células do *cumulus* (Shimada et al., 2003). Baseado nesses mecanismos,

recentemente Albuz et al. (2010), propuseram um sistema que simula a maturação fisiológica que ocorre *in vivo*, denominado de SPOM (do inglês, simulated physiological oocyte maturation) e que mostrou resultados promissores aumentando a produção de embriões. Esse sistema utiliza ativadores da adenil ciclase (AC), inibidores da fosfodiesterase (PDE) e hormônios envolvendo um curto período de pré-maturação e uma maturação prolongada. Portanto, apesar de sua eficiência ainda não ter sido avaliada e confirmada em outros laboratórios e por outros grupos de pesquisa, parece ser uma opção a ser testada, para melhorar a qualidade de ovócitos.

Outro fator importante é que na retomada espontânea da meiose, os ovócitos que ainda não atingiram sua total competência podem completar a maturação nuclear sem que a maturação citoplasmática ocorra simultaneamente, tendo seu desenvolvimento posterior comprometido. Tem sido sugerido que inibindo ou atrasando a maturação nuclear proporcionaria um tempo adicional ao ovócito para que as mudanças necessárias para aquisição da competência possam ocorrer e, também para que haja uma melhor sincronia entre maturação nuclear e citoplasmática aumentando a eficiência da MIV (Shu et al., 2008; Lonergan et al., 2001).

Vários métodos fisiológicos e farmacológicos podem ser utilizados para inibir a retomada da meiose. Os métodos fisiológicos, tais como a adição de líquido folicular no meio de cultura (Lonergan, 2007) e cultivo em hemi-seções de folículos (Oliveira e Silva, 2008), em geral, são de duração mais curta e menos eficientes do que os farmacológicos. Agentes que elevam os níveis de AMPc, tais como inibidores específicos da fosfodiesterase (PDE) e ativadores da adenil ciclase (AC) mostram-se eficientes em inibir a retomada espontânea da meiose em murinos (Nogueira et al., 2003), bovinos (Aktas et al., 1995; Luciano et al., 2011) e humanos (Nogueira et al., 2006; Vanhoutte et al., 2008). Outros fármacos tais como 6- dimetilaminopurina (6-DMAP), que age no fator de promoção da meiose (MPF) e inibidores específicos de quinases dependentes das ciclinas (Cdk), tais como a butirolactona I e a roscovitina, também têm sido utilizados com sucesso para manter os ovócitos no estágio de vesícula germinativa (Dode & Adona, 2001; Adona et al., 2006; Barreto et al., 2010).

Mais recentemente inibidores da PDE tipo 3 que é específica do ovócito e são responsáveis pela hidrólise do AMPc, tem sido utilizado (Jee et al. 2009). Portanto, o uso de agentes inibidores específicos da PDE-3 mantêm os níveis intraovocitários de AMPc elevados e, faz com que o ovócito fique retido em VG (Conti et al. 2002; Thomas et al. 2002), sem afetar as células do *cumulus*. Dentre esses agentes, a

cilostamida tem sido utilizada em humanos (Nogueira et al., 2006; Shu et al, 2008), camundongos (Nogueira et al., 2003; Vanhoutte et al., 2007; Yeo et al., 2009) e ovinos (Rose et al., 2012). Entretanto, existem poucos relatos do seu uso em bovinos (Albuz et al., 2010; Luciano et al., 2011).

Apesar de vários estudos utilizando diferentes substâncias para reter a meiose terem sido realizados, a maioria indica que um cultivo de pré-maturação mantendo o ovócito em VG por si só, não é capaz de simular o que acontece no período de capacitação do ovócito, e um aumento na competência para o desenvolvimento não tem sido observada (Lonergan et al., 2000; Wu et al., 2006; Adona & Leal, 2004). Esses resultados sugerem que alternativas precisam ser avaliadas para que possam melhorar a eficiência da MIV.

No presente estudo foi avaliado o sistema SPOM, já que o mesmo mostrou resultados promissores aumentando a produção de embriões em bovinos e camundongos. Além disso, também foi testada uma forma alternativa de retenção utilizando a cilostamida, que age na PDE-3, e adicionado insulina-transferrina- selênio (ITS), que promove a sobrevivência celular (Hammami et al.,2012) e protege contra os danos oxidativos (Córdova et al., 2010) durante o período de retenção, visando melhorar a qualidade dos ovócitos utilizados para a PIVE.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes e Químicos

Ao menos que indicado, os reagentes utilizados para este experimento, bem como os produtos químicos utilizados para a preparação dos meios de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, foram adquiridos da Sigma Sto. Louis, MO, USA.

### 4.2 Recuperação e Seleção dos ovócitos oriundos de folículos de 3-8 mm

Ovários foram coletados em abatedouros locais de fêmeas mestiças (*Bos indicus* X *Bos taurus*), imediatamente após o abate e transportados em solução salina 0,9% (NaCl), suplementada com antibióticos (estreptomicina - 100µg/ml e penicilina G - 100 UI/ml) à temperatura de 35-36° C. O tempo de coleta do abate até o momento da aspiração dos folículos foi observado para não exceder o tempo limite de 4 horas.

Os complexos-*cumulus*-ovócitos (COC) foram aspirados de folículos de 3-8 mm de diâmetro com auxílio de bomba à vácuo, acoplada a um escalpe de calibre 18 – G. O material aspirado foi depositado em tubos plásticos de 15 ml (TPP<sup>®</sup>, Trasadingen, Suíça) e, após a sedimentação do mesmo, foi retirado 10 ml do líquido folicular, que foi centrifugado por 5 minutos, à 37°C e à 700g, e utilizado para procura e seleção dos COCs. O sedimento contendo os ovócitos foi transferido para placas estéreis de poliestireno de 96 mm de diâmetro (TPP<sup>®</sup>, Trasadingen, Suíça) contendo líquido folicular e avaliado em lupa estereoscópica (Stemi SV6, Zeiss<sup>®</sup>, Germany). Os ovócitos

com *cumulus* compacto, possuindo pelo menos quatro camadas de células e com citoplasma homogêneo foram selecionados para serem utilizados para a maturação.

#### **4.3 Obtenção de ovócitos oriundos de folículos de 1-3 mm**

Ovócitos incompetentes foram obtidos de acordo com a metodologia descrita por Caixeta e Dode (2008). Folículos entre 1-3 mm foram dissecados da córtex ovariana, com auxílio de pinça, tesoura e bisturi e mantidos em meio de lavagem-TCM-199 com sais de Hank's (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada), suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino) e 0,075 mg/ml de amicacina e sobre placa aquecedora a 37°C durante o processo. Uma vez dissecados, os folículos foram mensurados com auxílio de uma ocular graduada (*micrometer eyepiece* OSM-4® Olympus, Tokyo, Japan) e aqueles com diâmetro de 1-3mm foram utilizados. Para obtenção dos ovócitos os folículos foram rompidos para a obtenção dos COCs.

Somente os COCs com pelo menos quatro camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo foram utilizados.

Foi respeitado um tempo total máximo de duas horas, entre o início da dissecação e início da maturação.

#### **4.4 Maturação *in vitro***

Imediatamente após a seleção, os COCs foram transferidos para o meio de maturação convencional, que consistia de TCM-199 com sais de Earl's, suplementado com 0,075 mg/ml de amicacina, 10% de SFB, 1 µg/mL de L-glutamina e 0,01 UI/ml de FSH, em gotas de 200µl com até 30 estruturas, cobertas com óleo siliconado (360 Medical Fluid 350 CST- DOW CORNING®) e, maturados por 22 horas a 38,5°C em 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

#### **4.5 Solução estoque dos inibidores**

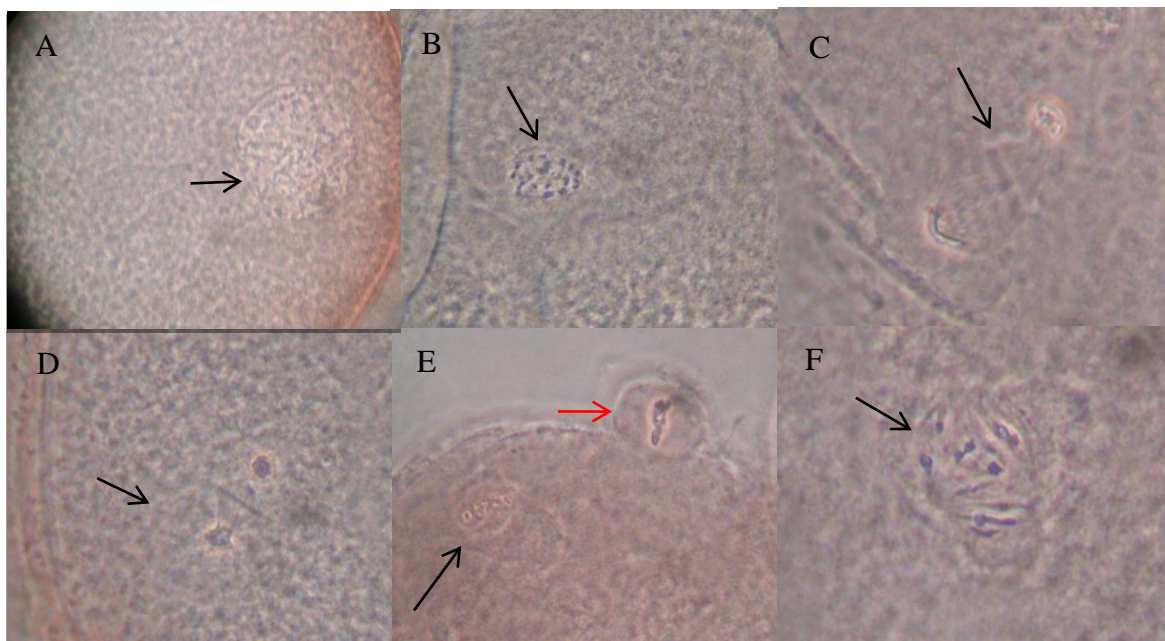
O ativador da AC, forskolin e os inibidores não específico da PDE, IBMX e específico da PDE 3, cilostamida, foram preparados em solução estoque de 100X em dimetilsulfóxido (DMSO) para as concentrações finais de 100 $\mu$ M, 500  $\mu$ M e 20  $\mu$ M, respectivamente, e aliqüotados em tubos para microcentrífuga e conservados no freezer a -20° C até o momento de uso, onde foram diluídos à fresco para cada réplica dos experimentos 1 e 2.

#### 4.6 Avaliação da Cinética de Maturação Nuclear

Para determinar a cinética de maturação nuclear o estágio da meiose, os ovócitos foram avaliados às 0, 8, 18 e 24 horas de maturação.

Para avaliar o estágio da meiose nos diferentes momentos os ovócitos foram retirados do cultivo, desnudados, fixados por 48 horas em etanol e ácido acético (3:1) e corados com lacmóide 45% em ácido acético glacial. Para os momentos de 0 e 8 horas, os ovócitos foram desnudados por sucessivas pipetagens até a retirada completa das células do *cumulus*. Já para as avaliações realizadas s 18 e 24 horas de maturação, os ovócitos foram expostos a uma solução com 0,3% de hialuronidase por um período de 5 minutos, e posteriormente submetidos a sucessivas pipetagens.

A avaliação dos estágios da meiose foi realizada em microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse E200, 1,000X) e classificados em: vesícula germinativa (VG), vesícula germinativa rompida (GVBD, do inglês, germinal vesicle break down); metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI) e metáfase II (MII), com alinhamento dos cromossomos na placa metafásica e extrusão do 1° corpúsculo polar. Foram considerados degenerado-anormais, os ovócitos que apresentavam a cromatina com alguma aberração ou que não era possível identificar o estágio (Figura 4).



**Figura 4:** Avaliação dos estágios da meiose de ovócitos corados com Lactomide a 45%. A: Vesícula Germinativa- VG; B: Metáfase I- MI, C: Anáfase I- AI, D: Telófase I- TI, E: Metáfase II- MII. Seta preta indica a placa metafásica e seta vermelha indica 1º corpúsculo polar; F: anormal-degenerado (anormalidade apresentada como fusos multidirecionais). 100X.

#### 4.7 Seleção espermática e fecundação *in vitro*

Após a MIV por 22 a 24 horas, a fecundação foi realizada utilizando-se em todas as manipulações, sêmen congelado da mesma partida de touro da raça Nelore, previamente testado para o sistema PIVE do Laboratório de Reprodução Animal (LRA) da Embrapa/Cenargen. O sêmen foi descongelado a uma temperatura de 36-37°C em banho-maria e posteriormente selecionado pelo gradiente de *Percoll* 90% (400µl) e 45% (400µl), preparados em microtubos de 2 ml, centrifugado por 5 minutos a 5.400g (Machado, 2009). Após esse período, o pellet obtido foi transferido para 1 ml de meio TALP (Parrish et al., 1995) e novamente centrifugado às mesmas condições anteriores. O pellet obtido nesta etapa foi ressuscitado em meio de fecundação que consistia de meio TALP suplementado com 0,5 mM de penicilamina, 0,25 mM de hipotaurina, 25



mM de epinefrina e 10µg/ml de heparina. Para a dose inseminante, calculou-se o valor a ser adicionado na gota de forma a obter uma concentração final de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml.

Os ovócitos após serem lavados duas vezes, foram transferidos para gotas de 200 µl de meio de fecundação, cobertas com óleo siliconado onde foram co-incubados com os espermatozoides a 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar por um período de 18 horas. O dia da inseminação foi considerado como D0.

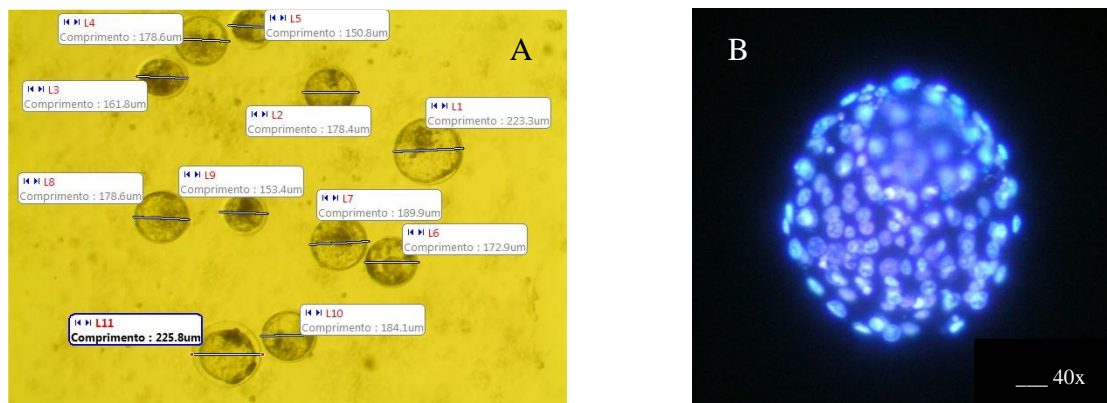
#### **4.8 Cultivo *in vitro***

Após o período de fecundação, os possíveis zigotos foram gentilmente pipetados para a remoção das células do *cumulus*, lavados duas vezes e transferidos para o meio de fluido sintético de oviduto (SOF), suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais 0,34 mM de sódio tri citrato, 2,77 mM de myo-inositol e 5% de SFB (SOFaaci– Holm et al., 1999), em gotas de 200µl cobertas por óleo mineral, incubados em estufa a 38,5°C e com 5% de CO<sub>2</sub>. em ar.

Os embriões foram avaliados em D2 para avaliação da clivagem e em D6, D7 e D8 pós-inseminação (p.i.) para a produção de blastocitos.

#### **4.9 Contagem do número de células**

Em D7 ou D8 os embriões foram mensurados com auxílio da câmera Motic (Moticam<sup>®</sup> 2.0 Plus, Japan) e classificados de acordo com o seu diâmetro nas categorias de 120-140; 141-160 e > 160µm. Os embriões com diâmetro > 160µm foram utilizados para avaliação do número de células. Para essa avaliação, os embriões foram expostos ao corante Hoechst 33342, na concentração de 1µg/ml em PBS e colocados em uma placa de 4 poços (NUNC<sup>®</sup>, Denmark) com a solução corante e incubados por 5 minutos, protegidos da luz e posteriormente transferidos para lâminas e cobertos com lamínula. Após esse período os embriões foram levados ao microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss<sup>®</sup> Germany- filtro 24, com comprimento de onda de 494/518nm de excitação/emissão) onde o número de núcleos das células foram contados (Figura2. 5).



**Figura 5:** A) Mensuração dos embriões D7 e B) Blastocistos em D7 corado por Hoechst 33342, para contagem do número total de células.

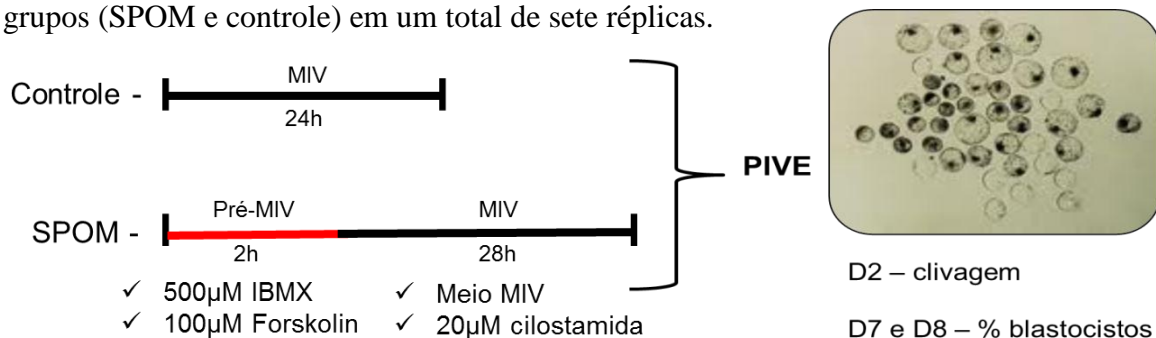
#### 4.10 Avaliação da viabilidade das células do *cumulus*

Para avaliar a viabilidade celular foi utilizado o corante azul de Trypan que penetra nas células que perderam a integridade de membrana. As células do *cumulus* foram obtidas de um total de 10 COCs, que foram pipetados repetidamente em uma gota de 100 µl de PBS formando uma suspensão celular. Os ovócitos foram descartados e 10 µl desta suspensão foram adicionados em tubo tipo ependorf contendo 10 µl do corante Azul de Trypan, perfazendo um volume total de 20µl. Após homogeneizar a mistura, foi retirado 10µl e dispensado na Câmara de Neubauer para realização da contagem. No quadrante central procedeu-se a contagem das células coradas e não coradas em azul, de cada amostra, em duplicata. O cálculo de percentagem de células viáveis foi baseado na divisão das células não coradas (vivas) pelo total de células contadas (coradas- cc e não coradas- cnc).

#### 4.11 Delineamento Experimental

##### 4.11.1 Experimento 1: Avaliação da metodologia SPOM para produção *in vitro* de embriões bovinos

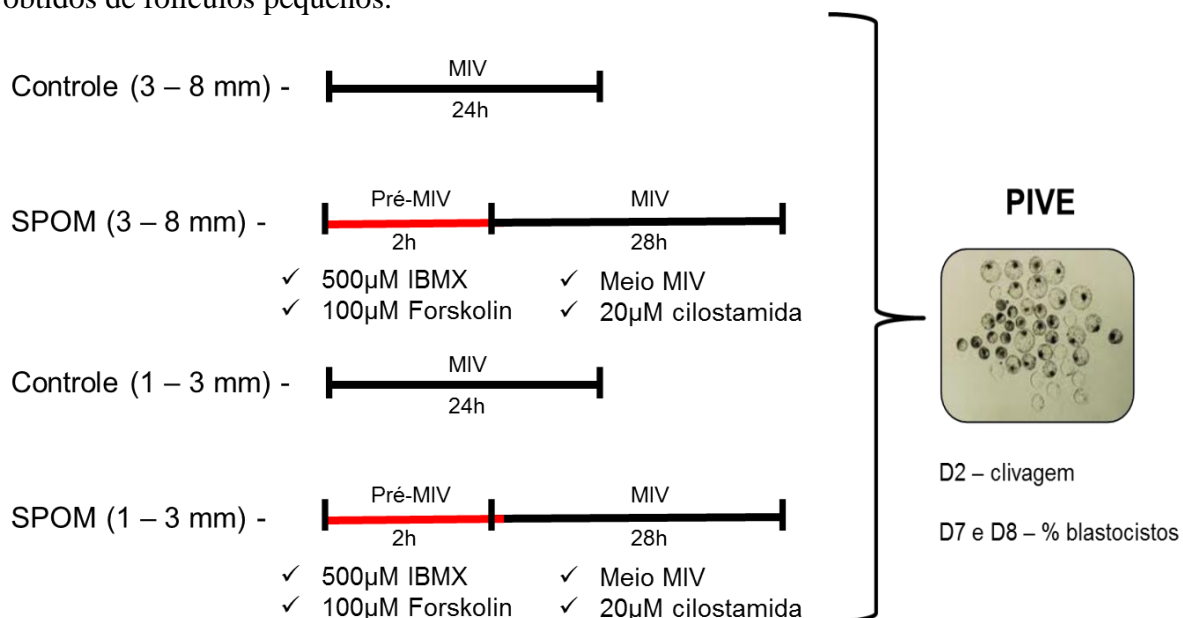
Na primeira etapa deste experimento objetivou avaliar o uso do sistema SPOM nas condições do LRA. Inicialmente foram utilizados 871 COCs, distribuídos em dois grupos (SPOM e controle) em um total de sete réplicas.



**Figura 6 - Esquema representativo do delineamento da 1ª etapa do experimento 1.**

Após o período de maturação, os ovócitos de ambos os grupos foram fecundados (FIV) e cultivados *in vitro* (CIV). No D2 os embriões foram avaliados para a taxa de clivagem e em D7 e D8 para a taxa de blastocisto.

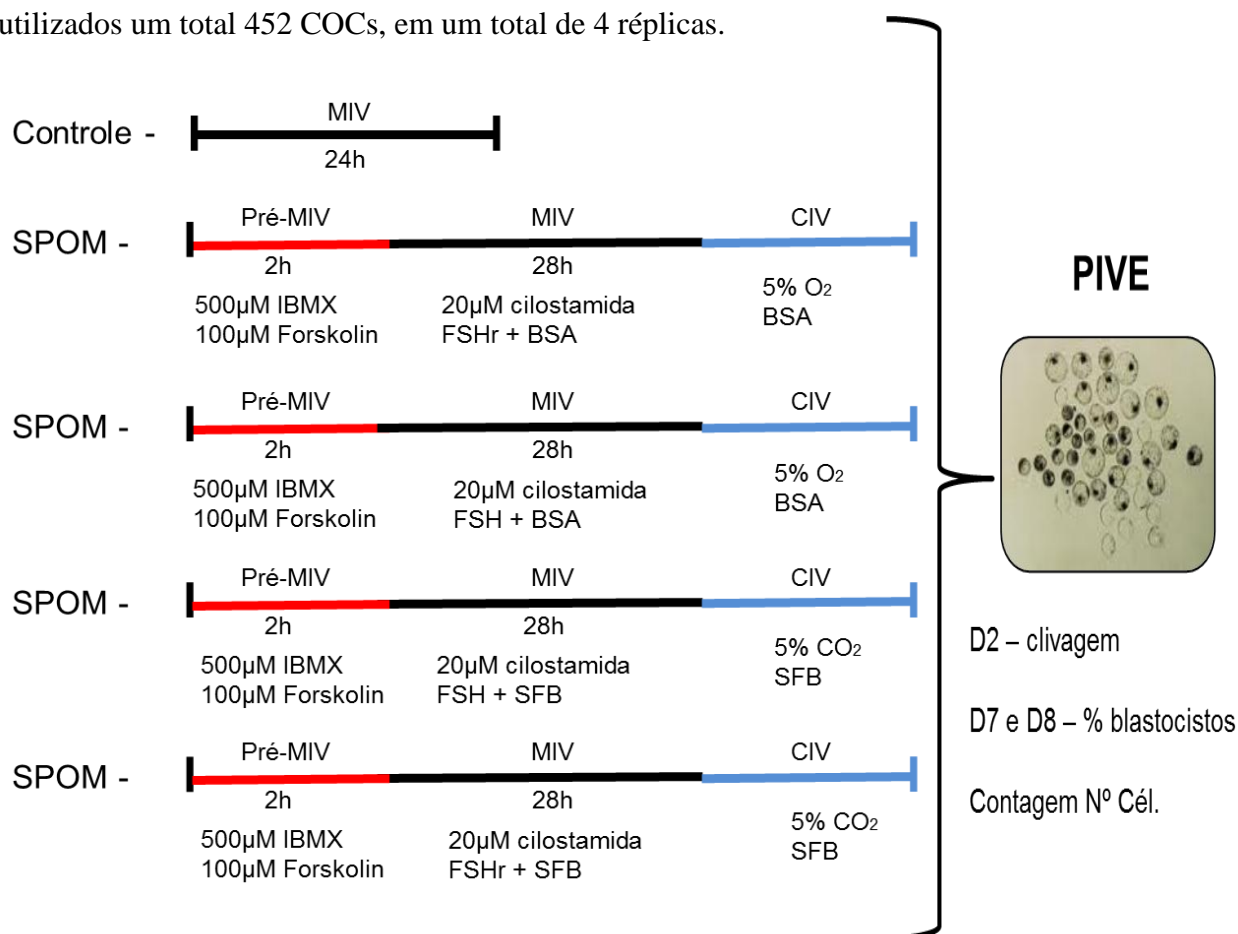
Como na metodologia SPOM é utilizada uma concentração de FSH superior à utilizada no meio de maturação convencional, na segunda etapa deste experimento foi testado o mesmo sistema anterior apenas alterando a concentração de FSH do meio de maturação de 0,01 UI/ml para 0,1 UI/ml. Essa alteração foi utilizada também para comparar ovócitos rotineiramente utilizados para a MIV e ovócitos menos competentes obtidos de folículos pequenos.



**Figura 7 - Esquema representativo do delineamento da 2ª etapa do experimento 1.**

Foram utilizados 1040, distribuídos em quatro grupos, em um total de 12 réplicas. Após a MIV os quatro grupos foram submetidos à fecundação e cultivo *in vitro*. O desenvolvimento embrionário foi avaliado no D2, D7 e D8.

A última etapa desse experimento consistiu na avaliação do sistema SPOM adaptado ao sistema do LRA, utilizado o mesmo protocolo dos experimentos anteriores apenas foi alterado o FSH utilizado na maturação, a concentração de O<sub>2</sub> (5%) durante o cultivo e a substituição do SFB por Albumina sérica Bovina- *Fat Albumine Free* (BSA-FAF) nos meios de maturação e cultivo. Essas alterações foram realizadas na tentativa de tornar o sistema o mais próximo possível do originalmente descrito. Para isso, foram utilizados um total 452 COCs, em um total de 4 réplicas.



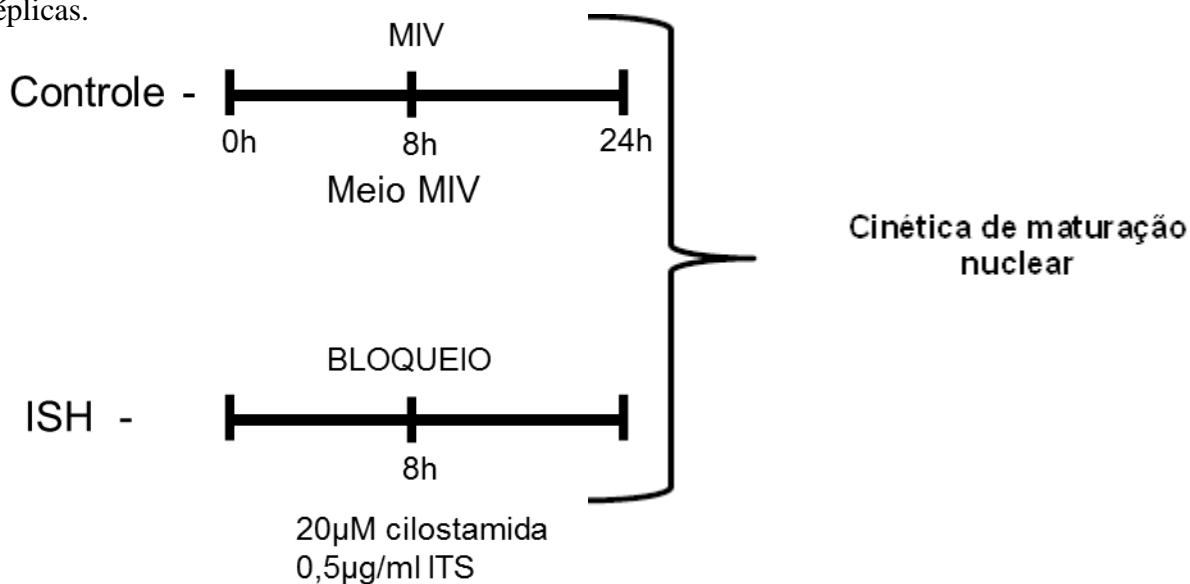
**Figura 8 - Esquema representativo do delineamento da 3ª etapa do experimento 1.**

Em todos os grupos, após a MIV os ovócitos foram fecundados e cultivados *in vitro* até o D8. O desenvolvimento embrionário foi avaliado no D2, D7 e D8, sendo que os blastocistos de D8 foram mensurados e aqueles maiores que 160µm foram corados para avaliação do número total de células.

#### 4.11.2 Experimento 2: Avaliação da cinética de maturação nuclear e do desenvolvimento embrionário de ovócitos bovinos submetidos à pré-maturação por 8 ou 24 horas

Baseado nos princípios da metodologia SPOM e de vários sistemas que utilizam retenção meiótica, foi proposto neste segundo experimento um sistema de maturação em que os ovócitos foram submetidos a um período de pré-maturação utilizando um inibidor da PD3, em que diferente dos demais estudos, nesse período o meio de retenção foi suplementado com fatores benéficos ao ovócito. Ou seja, foi fornecido ao ovócito um tempo adicional, na presença de ITS, que promove a sobrevivência celular e protege contra os danos oxidativos.

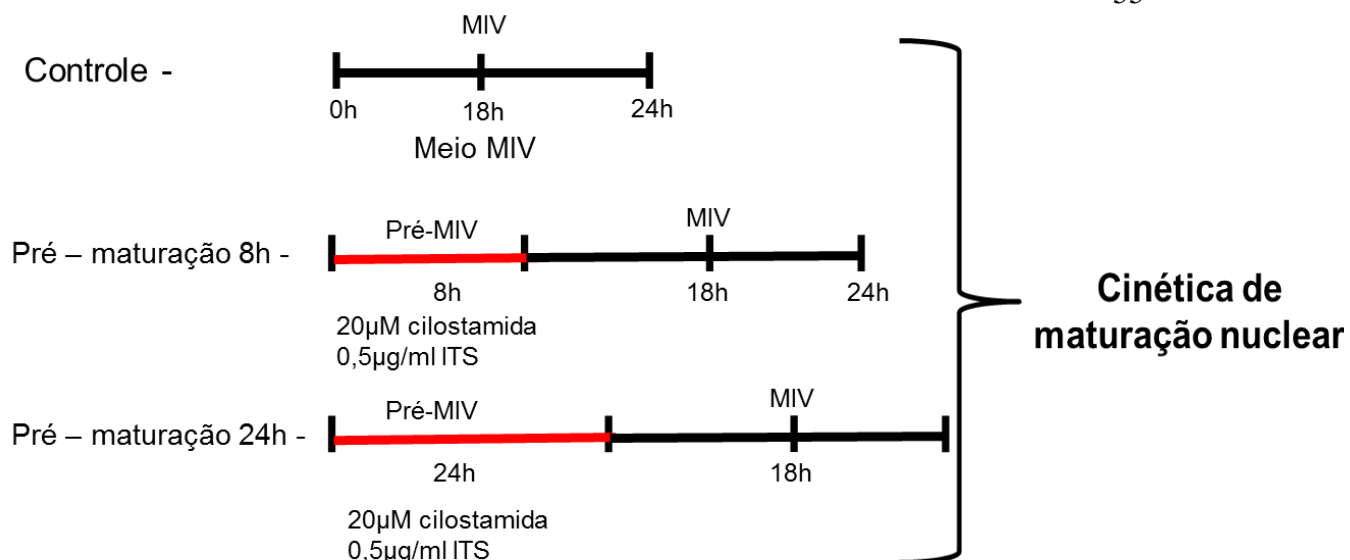
Inicialmente foi testado se o inibidor a ser utilizado (cilostamida) seria capaz de manter a retenção meiótica. Para isso, foram utilizados 489 COCs, em um total de 5 réplicas.



**Figura 9 - Esquema representativo do delineamento da 1ª etapa do experimento 2.**

Em cada um desses momentos os ovócitos foram retirados do meio de maturação e desnudados, fixados e corados para a determinação do estágio da meiose.

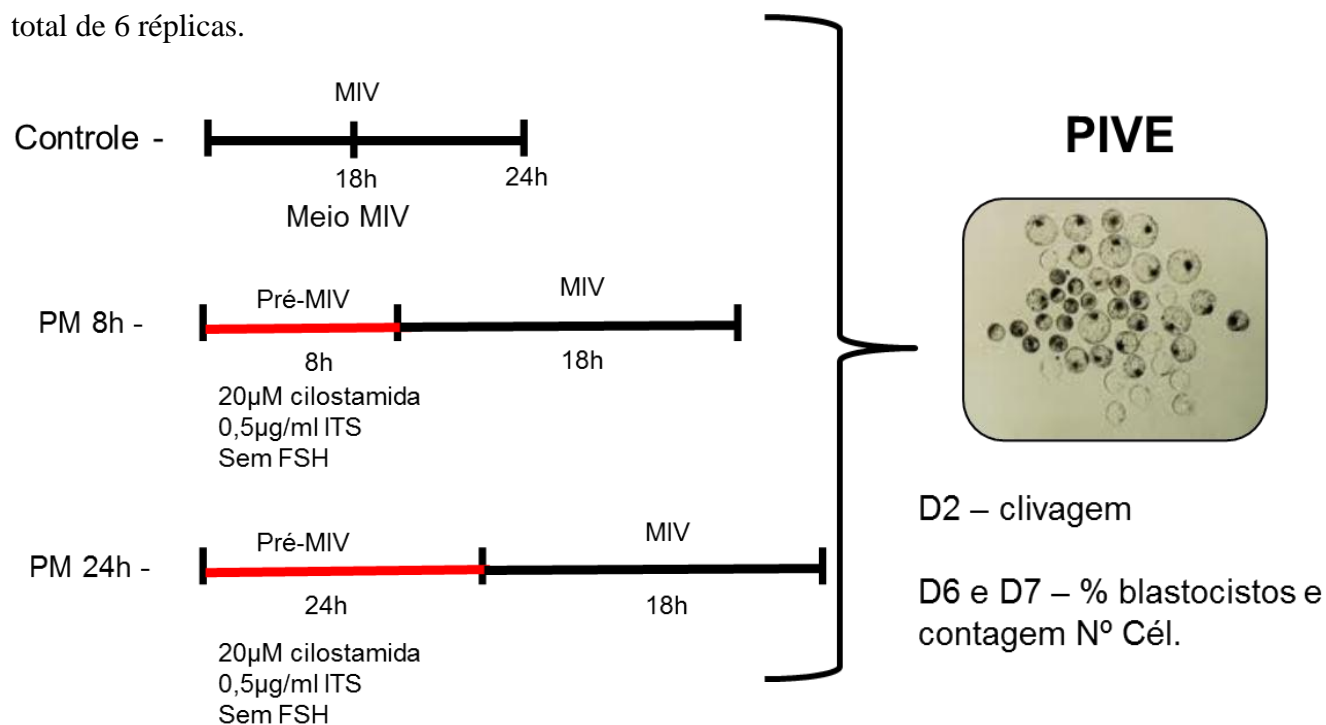
Posteriormente, foi avaliado se o período de retenção (pré-maturação) afetaria a cinética da progressão da meiose. Foram utilizados 928 COCs, em um total de 9 réplicas.



**Figura 10 - Esquema representativo do delineamento da 1º etapa do experimento 2.**

Essa avaliação foi realizada para determinar o momento mais apropriado para a fecundação. Sendo que os COCs foram submetidos a um período de pré-maturação e, posteriormente maturados por 18 e 24 horas. No final da maturação os ovócitos foram desnudados, fixados e corados para avaliação do estágio da meiose.

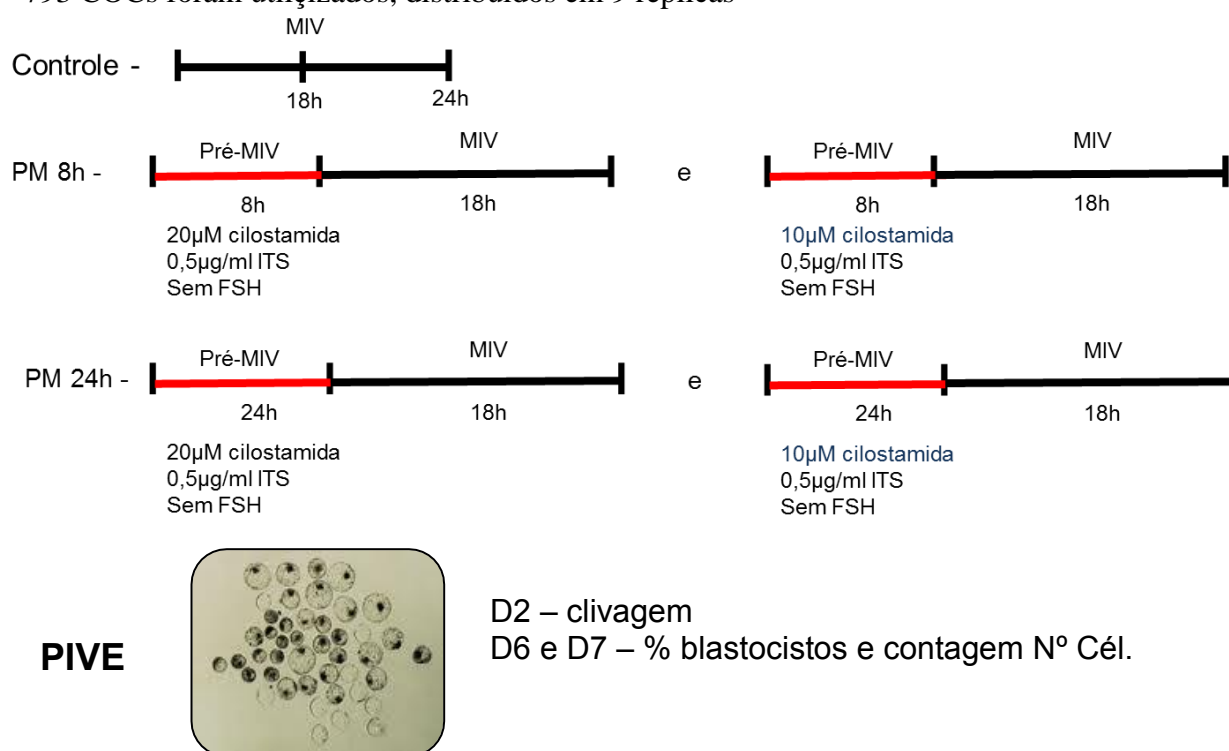
O efeito do período de retenção na presença de cilostamida e ITS na produção e qualidade os embriões foi então estudado. Para tanto, foram utilizados 538 COCs, em total de 6 réplicas.



**Figura 11 - Esquema representativo do delineamento da 2º etapa do experimento 2.**

Os COCs foram submetidos ao período de pré-maturação por 8 e 24 horas, submetidos à maturação *in vitro* por 18 horas, quando então foi realizada a FIV. Os embriões foram avaliados no D2 para clivagem e no D6 e D7 para a taxa de blastocisto. Em D7 os embriões foram mensurados e os com diâmetro > 160  $\mu\text{m}$  foram corados com Hoescht 33342 para a contagem do número de células.

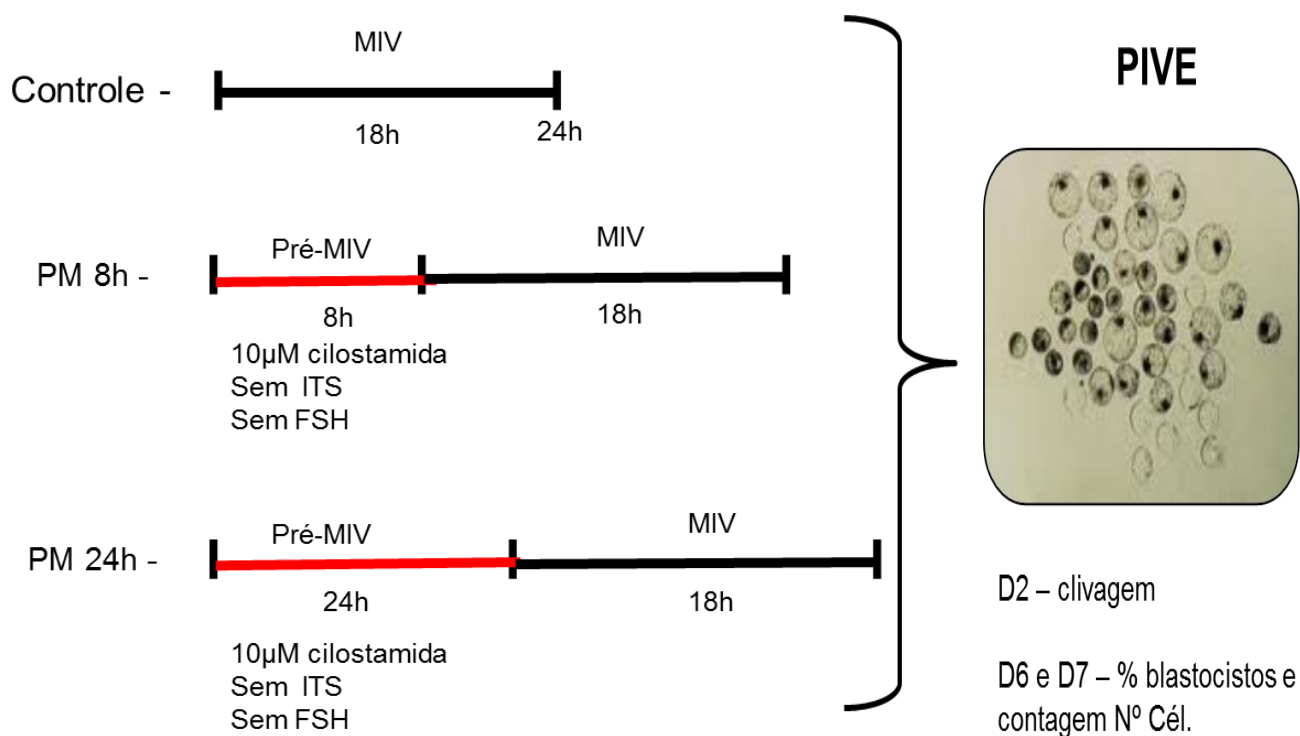
Para verificar se a cilostamida teria algum efeito deletério no COCs, o mesmo protocolo dos experimentos anteriores foi realizado, utilizando a metade da concentração de cilostamida, sendo avaliada a viabilidade das células do *cumulus* após a retenção e maturação e a qualidade e quantidade de embriões produzidos. Um total de 793 COCs foram utilizados, distribuídos em 9 réplicas



**Figura 12 - Esquema representativo do delineamento da 2ª etapa do experimento 2.**

Após a MIV, parte dos ovócitos foram desnudados e as células do *cumulus* utilizados para avaliação da viabilidade pelo corante azul de Trypan. A outra parte foi submetida à FIV conforme descrição acima, sendo avaliada a taxa de clivagem (D2), de blastocisto em D6 e D7 percentagem dos blastocistos de D7 que apresentavam diâmetro > 160  $\mu\text{m}$  e do número total de células.

E, finalmente, para assegurar que o efeito da cilostamida não era influenciado pela presença do ITS, foram comparados os grupos submetidos à retenção, mas sem a presença de ITS. 467 COCs foram utilizados, distribuídos em 5 réplicas.



**Figura 13 - Esquema representativo do delineamento da 2ª etapa do experimento 2.**

Após a FIV, os embriões foram avaliados no D2 para clivagem e no D6 e D7 para a taxa de blastocisto. Em D7 os embriões foram mensurados e os com diâmetro >160 µm foram corados com Hoescht 33342 para a contagem do número de células.

#### 4.12 Análise Estatística

Os resultados obtidos de taxa de maturação e desenvolvimento embrionário foram analisados pelo teste do Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). Os dados de mensuração de embriões e contagem do número de células, que tiveram uma distribuição anormal, foram considerados dados não paramétricos e então foram comparados entre os tratamentos utilizando o teste de Kruskal-Wallis, pelo programa Prophet, versão 5.0 (BBN systems and Technologies, 1996).



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Resultados

#### 5.1.1 Experimento 1 - Avaliação da metodologia SPOM para produção *in vitro* de embriões bovinos

No primeiro experimento foi avaliado se o método SPOM adaptado ao sistema de PIVE utilizado no LRA teria efeito benéfico na produção de embriões *in vitro*.

Inicialmente o sistema SPOM foi inserido no protocolo sem que nenhuma mudança na composição dos meios fosse realizada. Os resultados mostraram que não só a taxa de clivagem, mas também as taxas de blastocisto em D7 e D8 foram menores em ovócitos submetidos ao sistema SPOM, se comparados aos do grupo controle (Tabela 1).

**Tabela 1. Avaliação do desenvolvimento embrionário de ovócitos bovinos submetidos ao sistema que simula a maturação ovocitária fisiológica (SPOM) e a maturação convencional (Controle).**

| Grupos   | Nº ovócitos | Blastocistos D6 (%±dp)      | Blastocistos D7 (% ±dp)     | Blastocistos D8 (%±dp)      |
|----------|-------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Controle | 310         | 243 (78,4±1,0) <sup>a</sup> | 142 (45,8±3,9) <sup>a</sup> | 155 (47,0±1,6) <sup>a</sup> |
| SPOM     | 561         | 297 (52,9±1,5) <sup>b</sup> | 69 (12,3±0,6) <sup>b</sup>  | 81 (17,2±1,3) <sup>b</sup>  |

<sup>a,b</sup> Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa por  $\chi^2$  ( $P < 0,05$ ).

Na segunda etapa, o sistema SPOM foi testado utilizando o mesmo protocolo anterior apenas alterando a concentração de FSH (0,1 UI/ml) do meio de maturação. Além disso, foi também avaliada se esse sistema afetaria de forma diferente ovócitos

incompetentes, obtidos de folículos compreendidos entre 1-3 mm dissecados da córtex ovariana.

A taxa de clivagem (D2) e produção de blastocisto (D7 e D8) foram superiores no grupo Controle, do que nos demais grupos (Tabela 2). O sistema SPOM teve efeito deletério ( $P < 0,05$ ) no desenvolvimento embrionário quando ovócitos oriundos de folículos de 3-8 mm foram utilizados. Apesar dos ovócitos de folículos menores apresentarem menor capacidade de desenvolvimento embrionário dos que os do controle, o desenvolvimento embrionário desses embriões não foi afetado pelo sistema SPOM (Tabela 2).

**Tabela 2. Avaliação do desenvolvimento embrionário de ovócitos bovinos submetidos à simulação fisiológica de maturação ovocitária (SPOM) e a maturação convencional (Controle) de ovócitos obtidos de folículos de 3-8 mm (utilizados rotineiramente) e de folículos dissecados de 1-3 mm (ovócitos incompetentes).**

| Grupo           | Nº ovócitos | Clivagem D2 (%±dp)          | Blastocisto D7 (%±dp)       | Blastocisto D8 (%±dp)       |
|-----------------|-------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Controle        | 598         | 491 (82,1±2,6) <sup>a</sup> | 271 (45,3±2,1) <sup>a</sup> | 297 (47,0±1,4) <sup>a</sup> |
| Spom 3-8 mm     | 321         | 175 (54,5±2,4) <sup>b</sup> | 38 (11,8±1,9) <sup>b</sup>  | 38 (11,8±1,9) <sup>b</sup>  |
| Controle 1-3 mm | 54          | 32 (59,3±0,9) <sup>b</sup>  | 11(20,4±1,3) <sup>b</sup>   | 11 (20,4±1,3) <sup>b</sup>  |
| Spom 1-3 mm     | 67          | 34 (50,7±2,4) <sup>b</sup>  | 9 (13,4±1,4) <sup>b</sup>   | 9 (13,4±1,4) <sup>b</sup>   |

<sup>a,b</sup>Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa por  $\chi^2$ . ( $P < 0,05$ ).

Para verificar se a baixa taxa de desenvolvimento embrionário foi devido às condições de cultivo diferentes, foi testado o mesmo sistema utilizado anteriormente, mas alterando a origem e concentração de FSH, a atmosfera gasosa durante o cultivo embrionário, e a fonte proteica utilizada na suplementação do meio de maturação e de cultivo. Os resultados obtidos para o grupo submetido ao SPOM nas condições do LRA utilizando FSH porcino, alta tensão de O<sub>2</sub> e suplementação com SFB apresentou os inferiores ao controle resultados (Tabela 3), os quais foram semelhantes aos encontrados na primeira etapa desse experimento (Tabelas 1 e 2).

Quando essas mesmas condições foram utilizadas com o FSHr e em concentração maior, as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário foram drasticamente reduzidas. Quanto o SFB foi substituído pelo BSA e o cultivo foi

realizado sob baixa tensão de O<sub>2</sub>, independente do tipo e concentração de FSH utilizado, as taxas de clivagem foram semelhantes ao controle. Entretanto as taxas de blastocisto foram inferiores ao controle (Tabela 3). Apesar disso, esses grupos apresentaram embriões de qualidade similar aos do controle, sendo a percentagem dos embriões que atingiram o tamanho maior de 160 µm, o número total de células e a média do tamanho foram semelhantes (Tabela 4)

**Tabela 3. Avaliação do desenvolvimento embrionário de ovócitos bovinos submetidos à simulação fisiológica de maturação ovocitária (SPOM) em que foi utilizado FSH ou FSH recombinante (FSHr), baixa (↓O<sub>2</sub>) na presença de soro ealta (↑O<sub>2</sub>) tensão de oxigênio na presença de BSA.**

| Grupo                      | Nº. ovócitos | Clivagem D2 (%±dp)         | Blastocisto D6 (%±dp)      | Blastocisto D7 (%±dp)      | Blastocisto D8 (%±dp)      |
|----------------------------|--------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Controle                   | 89           | 69 (77,5±1,7) <sup>a</sup> | 28 (40,5±1,6) <sup>a</sup> | 29 (42±2,0) <sup>a</sup>   | 29 (42±2,0) <sup>a</sup>   |
| Spom ↓O <sub>2</sub> +FSHr | 91           | 64 (70,3±2,2) <sup>a</sup> | 17 (26,5±1,8) <sup>b</sup> | 17 (26,5±1,8) <sup>b</sup> | 17 (26,5±1,8) <sup>b</sup> |
| Spom ↓O <sub>2</sub> +FSH  | 89           | 60 (67,4±1,4) <sup>a</sup> | 16 (26,6±1,7) <sup>c</sup> | 20 (33,3±1,2) <sup>c</sup> | 20 (33,3±1,2) <sup>c</sup> |
| Spom ↑O <sub>2</sub> +FSH  | 90           | 49 (54,5±1,2) <sup>b</sup> | 6 (12,2±2,0) <sup>d</sup>  | 6 (12,2±2,0) <sup>d</sup>  | 6 (12,2±2,0) <sup>d</sup>  |
| Spom↑O <sub>2</sub> +FSHr  | 93           | 35 (37,7±1,2) <sup>c</sup> | 2 (5,7±0,8) <sup>e</sup>   | 2 (5,7±0,8) <sup>e</sup>   | 2 (5,7±0,8) <sup>e</sup>   |

<sup>a,b,c,d,e</sup>Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa por  $\chi^2$  ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 4. Percentagem, mensuração e número total de células de embriões D8 com diâmetro > 160µm obtidos de ovócitos ao Sistema SPOM de maturação *in vitro* nas condições de baixa (↓O<sub>2</sub>) e alta (↑O<sub>2</sub>) de oxigênio, suplementado com FSH recombinante (FSHr) ou FSH porcino.**

| Tratamento                       | Total de Embriões N | Embriões N (%) | Nº de células (média±dp) | Mensuração embriões >160 (média±dp) |
|----------------------------------|---------------------|----------------|--------------------------|-------------------------------------|
| <b>Controle</b>                  | 29                  | 22 (75,9)      | 150,8±26,7 <sup>a</sup>  | 210,3±47,0 <sup>a</sup>             |
| <b>Spom ↓ O<sub>2</sub> rFSH</b> | 20                  | 12 (60,0)      | 139,6±35,6 <sup>a</sup>  | 210,1±57,6 <sup>a</sup>             |
| <b>Spom ↓O<sub>2</sub> FSH</b>   | 17                  | 16 (94,1)      | 137,9±51,6 <sup>a</sup>  | 218,5±56,5 <sup>a</sup>             |
| <b>Spom ↑O<sub>2</sub> FSH</b>   | 6                   | 3 (50,0)       | 125,0±41,0 <sup>b</sup>  | 163,4±63,9 <sup>b</sup>             |
| <b>Spom ↑O<sub>2</sub> rFSH</b>  | 2                   | 2 (100,0)      | 96,6±7,7 <sup>c</sup>    | 171,0±41,0 <sup>c</sup>             |

<sup>a,b,c</sup>Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

### 5.1.2 Experimento 2. Avaliação da cinética de maturação nuclear e do desenvolvimento embrionário de ovócitos bovinos submetidos à pré-maturação por 8 ou 24 horas

No segundo experimento foi proposto um sistema alternativo para a maturação que consistiu da retenção da meiose por 8 e 24 horas na presença de cilostamida e ITS.

Inicialmente foi avaliada a capacidade da cilostamida de manter a retenção meiótica, cujos resultados encontram-se na tabela 5. A avaliação de ovócitos às 0 h de maturação, ou seja, antes de serem colocados para maturar, mostrou que a maioria apresentava-se em estágio de vesícula germinativa (VG). No grupo controle após 8 horas de maturação, a maioria dos ovócitos tinha retomado a meiose e apresentavam a vesícula germinativa rompida, e após às 24 horas a maioria tinha completado a primeira divisão meiótica. Já a presença de cilostamida inibiu a retomada da meiose tanto às 8 horas quanto às 24 horas de cultivo (Tabela 5).

**Tabela 5. Avaliação do bloqueio de ovócitos bovinos cultivados no meio de maturação suplementado (I) ou não com cilostamida (Controle) por 0, 8 e 24 horas(h).**

| Tratamento   | Nº Ovócitos | Estágio da meiose           |                            |                            |                               |
|--------------|-------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|
|              |             | VG (%±dp)                   | VGBD (%±dp)                | MI, AI, TI (%±dp)          | MII (%±dp)                    |
| Controle 0h  | 82          | 80 (97,5) <sup>a</sup>      | 2 (1,2±1,7) <sup>a</sup>   | 0 (0) <sup>a</sup>         | 0 (0) <sup>a</sup>            |
| Controle 8h  | 101         | 3 (2,9±0,2) <sup>b,c</sup>  | 89 (93,0±2,4) <sup>b</sup> | 9 (3,9±0,2) <sup>a,b</sup> | 0 (0) <sup>a</sup>            |
| I 8h         | 104         | 102 (98,0±3,8) <sup>a</sup> | 2 (2,0±2,0) <sup>a</sup>   | 0 (0) <sup>a</sup>         | 0 (0) <sup>a</sup>            |
| Controle 24h | 102         | 0(0) <sup>c</sup>           | 0(0) <sup>a</sup>          | 7 (6,9±1,4) <sup>b</sup>   | 95<br>(93,1±4,1) <sup>b</sup> |
| I 24h        | 100         | 98 (98,0±3,8) <sup>a</sup>  | 2 (2,0±2,0) <sup>a</sup>   | 0 (0) <sup>a</sup>         | 0(0) <sup>a</sup>             |

VG: vesícula germinativa; VGBD: rompimento da vesícula germinativa; MI AI e TI: metáfase I, anáfase I e telófase I, respectivamente; MII: metáfase II, respectivamente.  
<sup>a,b,c</sup> Diferentes letras na mesma coluna indicam diferenças significativas por  $\chi^2$  (P<0,05).

Para avaliar se o período de retenção (pré-maturação) afetaria a cinética da progressão da meiose, os COCs foram submetidos à retenção por diferentes períodos e posteriormente, maturados por 18 e 24 horas. Os resultados mostraram que após a retenção por 8 ou 24 horas, a percentagem de ovócitos que atingem o estágio de metáfase II é semelhante nos grupos maturados por 18 ou 24 horas. Ou seja, nos grupos que foram retidos nenhum incremento na taxa de maturação foi observado se os ovócitos permaneceram até 24 horas no cultivo (Tabela 6).

**Tabela 6. Avaliação da maturação nuclear de ovócitos bovinos cultivados no meio de pré-maturação suplementado com cilostamida (20 µM), (0,5 mg/ml) ITS por 8 e 24 horas e posteriormente maturados *in vitro* por 18 e 24 horas.**

| Tratamento   | Nº Ovócitos | Estágio da meiose          |                          |                             |                                |
|--------------|-------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
|              |             | VG, N (%)                  | VGBD, N (%)              | MI, AI e TI, N (%)          | MII, N (%)                     |
| Controle 0h  | 82          | 79 (96,4±3,9) <sup>a</sup> | 0 (0) <sup>a</sup>       | 0 (0) <sup>a</sup>          | 0 (0) <sup>a</sup>             |
| Controle 18  | 85          | 0 (0) <sup>b</sup>         | 0 (0) <sup>a</sup>       | 12 (14,1±1,7) <sup>b</sup>  | 71 (83,5±1,3) <sup>b</sup>     |
| Controle 24  | 180         | 0 (0) <sup>b</sup>         | 0 (0) <sup>a</sup>       | 0 (0) <sup>a</sup>          | 174 (96,6±3,9) <sup>c</sup>    |
| PM8+ MIV 18  | 171         | 2 (1,1±0,8) <sup>b</sup>   | 3 (1,7±1,8) <sup>a</sup> | 13 (7,6±1,6) <sup>b,c</sup> | 141 (82,4±4,3) <sup>b</sup>    |
| PM8+ MIV 24  | 112         | 1 (0,9±0,5) <sup>b</sup>   | 1 (0,9±0,5) <sup>a</sup> | 4 (3,9±3,2) <sup>a,c</sup>  | 93 (83,0±8,0) <sup>b</sup>     |
| PM24+ MIV 18 | 153         | 0 (0) <sup>b</sup>         | 1 (0,7±1,9) <sup>a</sup> | 2 (1,3±1,4) <sup>a</sup>    | 143 (93,4±3,5) <sup>c</sup>    |
| PM24+ MIV 24 | 145         | 0 (0) <sup>b</sup>         | 2 (1,3±1,4) <sup>a</sup> | 2 (1,3±1,4) <sup>a</sup>    | 134 (92,4±2,01,3) <sup>c</sup> |

VG: vesícula germinativa; VGBD: rompimento da vesícula germinativa; MI, AI e TI: metáfase I, anáfase I e telófase I, respectivamente; MII: metáfase II, respectivamente. <sup>a,b,c</sup> Diferentes letras na mesma coluna indicam diferenças significativas por  $\chi^2$ . (P<0,05).

Como não houve diferença na taxa de maturação as 18 e 24 horas para os grupos inibidos por 8 e 24 horas optou-se por utilizar o período de 18 horas de maturação *in vitro* para avaliar o desenvolvimento embrionário.

A taxa de clivagem foi semelhante (P>0,05) entre os grupos, exceto o grupo que foi retido por 24 horas que apresentou uma taxa inferior (P<0,05) aos demais (tabela 7). Apesar da taxa de clivagem ser semelhante, os ovócitos maturados *in vitro* por 24 horas

apresentaram maior ( $P < 0,05$ ) taxa de blastocisto em D7. Já os grupos submetidos à pré-maturação tiveram o seu desenvolvimento embrionário afetado ( $P < 0,05$ ), sendo que quanto maior o período de retenção maior o efeito negativo (tabela 7).

**Tabela 7. Desenvolvimento embrionário de ovócitos bovinos submetidos à pré-maturação acrescida de 20 $\mu$ M de cilostamida e 0,05mg/ml de ITS, pelo período de 8 ou 24 horas, e posteriormente maturados *in vitro* por 18 horas.**

| Grupo         | Nº. ovócitos | Clivagem D2<br>(% $\pm$ dp)       | Blastocisto D6<br>(% $\pm$ dp)   | Blastocisto D7<br>(% $\pm$ dp)   |
|---------------|--------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Controle 18 h | 135          | 107 (79,2 $\pm$ 5,3) <sup>a</sup> | 27 (20,0 $\pm$ 2,3) <sup>a</sup> | 47 (34,8 $\pm$ 5,0) <sup>a</sup> |
| Controle 24 h | 138          | 107 (77,5 $\pm$ 3,3) <sup>a</sup> | 39 (28,2 $\pm$ 1,5) <sup>b</sup> | 63 (45,6 $\pm$ 3,5) <sup>b</sup> |
| PM8+MIV 18    | 139          | 98 (70,5 $\pm$ 5,0) <sup>a</sup>  | 15 (10,8 $\pm$ 1,0) <sup>c</sup> | 33 (23,7 $\pm$ 1,6) <sup>c</sup> |
| PM24+MIV 18   | 126          | 74 (58,7 $\pm$ 5,4) <sup>b</sup>  | 4 (3,1 $\pm$ 1,7) <sup>d</sup>   | 7 (5,5 $\pm$ 3,5) <sup>d</sup>   |

<sup>a,b,c,d</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa por  $\chi^2$ . ( $P < 0,05$ ).

Em D7 foi avaliado o tamanho desses embriões, que foram separados por categorias, onde apenas os embriões que se possuíam tamanho acima de 160  $\mu$ m foram corados com Hoescht 33342 para a contagem do número de células, como parâmetro de qualidade embrionária. Os embriões do grupo Controle 24 horas eram maiores que os demais embriões dos grupos Controle 18 horas e dos grupos pré-maturados. Esse grupo destacou-se também por obter um maior número de células dos embriões corados. O grupo pré-maturado por 24 horas, seguido por maturação por 18 horas apresentou-se inferior aos demais grupos para as duas avaliações realizadas (Tabela8).

**Tabela 8. Percentagem, mensuração e número total de células de embriões D7 com diâmetro > 160 $\mu$ m obtidos de ovócitos submetidos à pré-maturação por 8 (PM8+MIV 18) ou 24 horas (PM24+MIV 18) na presença de 20 $\mu$ M de cilostamida e 0,05 mg/ml de ITS e, posteriormente maturados *in vitro* por 18 horas.**

| Tratamento    | Total de Embriões<br>N | Embriões<br>N (%)      | Nº de células<br>(média $\pm$ dp) | Mensuração embriões<br>>160 (média $\pm$ dp) |
|---------------|------------------------|------------------------|-----------------------------------|--|
| Controle 18 h | 47                     | 32 (68,0) <sup>a</sup> | 108,8 $\pm$ 28,1 <sup>a</sup>     | 179,8 $\pm$ 15,7 <sup>a</sup>                |
| Controle 24 h | 63                     | 50 (79,3) <sup>a</sup> | 121,5 $\pm$ 34,8 <sup>b</sup>     | 181,5 $\pm$ 25,5 <sup>a</sup>                |
| PM8+MIV 18    | 33                     | 23 (70,0) <sup>a</sup> | 104,9 $\pm$ 23,4 <sup>a</sup>     | 179,2 $\pm$ 14,3 <sup>a</sup>                |
| PM24+MIV 18   | 7                      | 4 (57,1) <sup>a</sup>  | 99,7 $\pm$ 10,7 <sup>c</sup>      | 164,0 $\pm$ 4,5 <sup>b</sup>                 |

<sup>a, b, c</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam resultados diferentes ( $P < 0,05$ ).

Para avaliar se os resultados inferiores observados nos tratamentos com retenção era devido à presença da cilostamida, foi testada se a diminuição na sua concentração afetaria a resposta à retenção. O grupo que apresentou a maior taxa de clivagem foi o controle maturado por 24 horas, e que apresentou a menor taxa foi o grupo retido por 24 horas na presença de 20  $\mu\text{M}$  de cilostamida e maturados por 18 horas (Tabela 9), não havendo grande variação entre os demais grupos. Entretanto, a concentração de cilostamida e o tempo de exposição afetaram drasticamente a taxa de blastocisto. O melhor desenvolvimento embrionário entre os grupos tratados foi observado no grupo retido por 8 horas na presença da metade da concentração da cilostamida e maturado por 18 horas. Quando o desenvolvimento embrionário foi comparado entre os grupos retidos por 24 horas e maturados por 18, aquele exposto à metade da concentração de cilostamida foi o que apresentou melhor resultado (Tabela 9).

**Tabela 9. Desenvolvimento embrionário de ovócitos submetidos à pré-maturação por 8 e 24 horas na presença de 20 $\mu\text{M}$  (n) ou 10  $\mu\text{M}$  (1/2) de cilostamida e 0,05mg/ml de ITS seguido de MIV por 18 horas.**

| Grupo             | Nº Ovócitos | Clivagem D2 (% $\pm$ dp)            | Blastocisto D6 (% $\pm$ dp)      | Blastocisto D7 (% $\pm$ dp)      |
|-------------------|-------------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Controle 18 h     | 134         | 109 (81,3 $\pm$ 5,1) <sup>a</sup>   | 31 (23,1 $\pm$ 3,2) <sup>a</sup> | 49 (40,2 $\pm$ 3,7) <sup>a</sup> |
| Controle 24 h     | 139         | 129 (92,8 $\pm$ 6,1) <sup>b</sup>   | 41 (29,5 $\pm$ 4,4) <sup>b</sup> | 71 (51,8 $\pm$ 3,5) <sup>a</sup> |
| PM8+MIV 18 [n]    | 135         | 104 (77,4 $\pm$ 2,3) <sup>c</sup>   | 22 (16,3 $\pm$ 5,2) <sup>c</sup> | 47 (34,8 $\pm$ 1,4) <sup>c</sup> |
| PM24+MIV 18 [n]   | 126         | 77 (61,1 $\pm$ 3,3) <sup>d</sup>    | 9 (7,14 $\pm$ 1,6) <sup>d</sup>  | 20 (15,8 $\pm$ 1,9) <sup>d</sup> |
| PM8+MIV 18 [1/2]  | 135         | 120 (88,8 $\pm$ 4,0) <sup>b,c</sup> | 45 (33,3 $\pm$ 2,5) <sup>b</sup> | 55 (40,7 $\pm$ 5,8) <sup>a</sup> |
| PM24+MIV 18 [1/2] | 124         | 89 (71,7 $\pm$ 7,0) <sup>e,d</sup>  | 18 (14,5 $\pm$ 1,8) <sup>e</sup> | 32 (25,8 $\pm$ 2,8) <sup>e</sup> |

<sup>a,b,c,d</sup> Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa por  $\chi^2(P<0,05)$ .

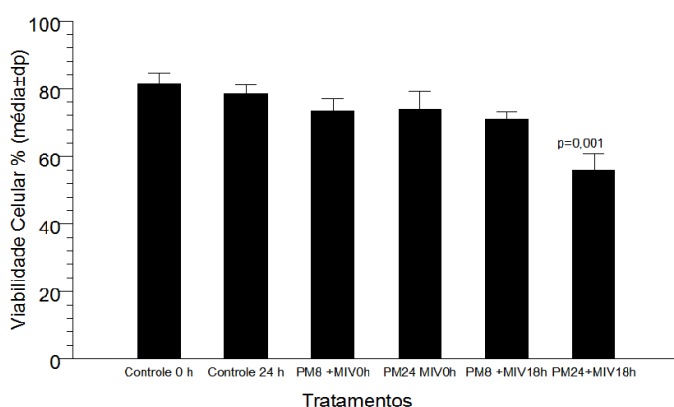
Além disso, a qualidade embrionária também foi avaliada (Tabela 10). Os grupos pré-maturados, independentemente do tempo, seja por 8 ou 24 horas, mostraram uma melhora quando a concentração de cilostamida foi reduzida pela metade, sendo que o tamanho dos embriões e o número total de células aumentaram. O grupo pré-maturado por 8 horas apresentou resultados semelhantes ao controle 18 horas (Tabela 10).

**Tabela 10. Percentagem, mensuração e número total de células de embriões D7 com diâmetro > 160µm obtidos de ovócitos submetidos à pré-maturação por 8 (PM8+MIV 18) ou 24 horas (PM24+MIV18) com 20µM(n) ou 10µM (1/2) de cilostamida e 0,05mg/ml de ITS, pelo período de 8 ou 24 horas, e posteriormente maturados *in vitro* por 18 horas.**

| Tratamento       | Embriões total | Embriões N (%)         | Nº de células (média±dp) | Mensuração embriões >160 (média±dp) |
|------------------|----------------|------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| Controle 18 h    | 49             | 31 (63,2) <sup>a</sup> | 127,4±44,3 <sup>a</sup>  | 185,3±23,8 <sup>a</sup>             |
| Controle 24 h    | 71             | 53 (74,6) <sup>a</sup> | 141,7±44,3 <sup>b</sup>  | 191,8±24,1 <sup>b</sup>             |
| PM8+MIV 18[N]    | 47             | 26 (55,3) <sup>b</sup> | 114,5±33,7 <sup>c</sup>  | 177,6±12,3 <sup>a</sup>             |
| PM24+MIV 18[N]   | 20             | 11 (55,0) <sup>b</sup> | 94,9±20,1 <sup>d</sup>   | 166,3±32,3 <sup>c</sup>             |
| PM8+MIV 18[1/2]  | 55             | 38 (69,0) <sup>a</sup> | 134,7±44,6 <sup>b</sup>  | 181,5±14,5 <sup>a</sup>             |
| PM24+MIV 18[1/2] | 32             | 23 (71,8) <sup>a</sup> | 105,5±23,3 <sup>c</sup>  | 167,8±48,6 <sup>c</sup>             |

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam resultados diferentes (P < 0,05).

Pelo fato do grupo pré-maturado por 24 horas mostrar sempre um baixo resultado, mesmo depois de reduzir à metade a concentração de cilostamida, a viabilidade celular das células do *cumulus* de ovócitos submetidos à inibição foi avaliada. No grupo controle, a percentagem de células viáveis foi semelhante antes (0h) e após a maturação *in vitro* (24h), com médias de 80,2% e 79,1% respectivamente. Entretanto, quando as células dos grupos retidos por 8 e 24 horas e do grupo retidos por 8 e maturados por 18 foram avaliadas nenhuma diferença na viabilidade foi observada (P>0,01). Uma diminuição acentuada na viabilidade (P<0.01) foi observada no grupo pré-maturado por 24 horas e maturado por 18 horas (Figura 2)



**Figura 14. Viabilidade de células do *cumulus* de ovócitos através da coloração de Azul de Trypan, submetidos à inibição com 10 µM de cilostamida e 0,05 mg/ml de ITS por 8 (PM8+MIV0) ou 24 horas (PM24+MIV0) e posteriormente maturados por 18 horas (PM8+MIV18 e PM24+MIV18).**



Para eliminar um possível efeito prejudicial do ITS, na redução da taxa de embriões, foi utilizado o mesmo sistema sem a presença do ITS. Como podem ser observadas (Tabela 11), as taxas de clivagem e blastocisto foram semelhantes ( $P>0,05$ ) entre grupos controle 24 horas e pré-maturado por 8 horas seguido de maturação por 18 horas. O grupo pré-maturado por 24 horas, apresentou produção de embriões inferior aos demais, demonstrando que este resultado é semelhante aos do experimento anterior, independente da presença ou não do ITS (Tabela 11).

**Tabela 11. Desenvolvimento embrionário de ovócitos submetidos à pré-maturação por 8 e 24 horas, seguido de MIV por 18 h, com a metade a concentração de  $10\mu\text{M}$  ( $[1/2]$ ) de cilostamida e sem adição de ITS no meio pré-maturação.**

| Grupo                    | Nº. ovócitos | Clivagem D2 (% $\pm$ dp)           | Blastocisto D6 (% $\pm$ dp)      | Blastocisto D7 (% $\pm$ dp)       |
|--------------------------|--------------|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Controle 18 h            | 117          | 90 (76,9 $\pm$ 3,6) <sup>a</sup>   | 29 (24,9 $\pm$ 4,1) <sup>a</sup> | 47 (40,17 $\pm$ 2,2) <sup>a</sup> |
| Controle 24 h            | 120          | 109 (90,8 $\pm$ 4,4) <sup>b</sup>  | 38 (31,7 $\pm$ 1,6) <sup>b</sup> | 57 (47,51 $\pm$ 3,5) <sup>b</sup> |
| PM8+MIV 18 [1/2] s/ ITS  | 112          | 100 (89, 3 $\pm$ 6,7) <sup>b</sup> | 33 (29,5 $\pm$ 4,8) <sup>c</sup> | 50 (44,64 $\pm$ 4,2) <sup>b</sup> |
| PM24+MIV 18 [1/2] s/ ITS | 118          | 83 (70,3 $\pm$ 6,1) <sup>a,c</sup> | 19 (16,1 $\pm$ 1,7) <sup>d</sup> | 32 (27,11 $\pm$ 2,8) <sup>c</sup> |

<sup>a,b,c,d</sup> Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa por  $\chi^2$  ( $P<0,05$ ).

Da mesma forma que o experimento anterior, verificou-se a qualidade embrionária por meio de mensuração dos embriões em D7, que foram divididos em categorias e os que se classificaram na categoria  $>160\mu\text{m}$  foram corados com Hoescht 33342 para contagem do número de células (Tabela 12). Entre os grupos Controle 18 horas, Controle 24 horas e pré-maturados por 8 horas, seguido de MIV por 18 horas, os embriões foram corados sua grande maioria, pois cerca de 70% destes embriões estavam inseridos na categoria de  $>160\mu\text{m}$ . E os dados obtidos mostraram que tanto o tamanho como o número de células contadas não diferiram para os grupos controle 18 e 24 horas, bem como o pré-maturado por 8 horas seguido de MIV por 18 horas ( $p=0,06$ ) mostrando que o ITS não causa um efeito deletério, entretanto, o grupo pré-maturado por 24 horas ficou um pouco inferior aos demais ( $p=0,01$ ), refletindo novamente os baixos resultados obtidos nos experimentos anteriores

**Tabela 12: Percentagem, mensuração e número total de células de embriões D7 com diâmetro > 160µm obtidos de ovócitos submetidos à pré-maturação por 8 (PM8+MIV 18) ou 24 horas (PM24+MIV18) com 10µM (1/2) de cilostamida e sem a adição de ITS e posteriormente maturados *in vitro* por 18 horas. pré-maturação.**

| Tratamento             | Embriões total | Embriões N (%)         | Nº de células (média±dp) | Mensuração embriões >160 (média±dp) |
|------------------------|----------------|------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| Controle 18 h          | 47             | 34 (72,3) <sup>a</sup> | 121,6±14,3 <sup>a</sup>  | 183,0±19,0 <sup>a</sup>             |
| Controle 24 h          | 57             | 40 (70,1) <sup>a</sup> | 127,5±13,8 <sup>a</sup>  | 185,0±23,0 <sup>a</sup>             |
| PM8+MIV 18[1/2] s/ ITS | 50             | 36 (72,0) <sup>a</sup> | 121,3±12,8 <sup>a</sup>  | 185,0±17,0 <sup>a</sup>             |
| PM24+MIV 18[1/2] S/ITS | 32             | 17 (53,2) <sup>b</sup> | 105,1±14,3 <sup>c</sup>  | 179,0±15,0 <sup>c</sup>             |

<sup>a,b,c</sup> Diferentes letras na mesma coluna indicam resultados diferentes ( $P < 0,05$ ).

## 5.2 Discussão

O principal fator ligado às baixas taxas de blastocistos obtidas na técnica de PIVE é que ovócitos imaturos utilizados para esta finalidade, em geral, ainda não adquiriram total competência para o desenvolvimento, devido a sua retirada prematura do ambiente folicular. Dessa forma, é necessário desenvolver alternativas para o aprimoramento da técnica de MIV de forma a oferecer condições adequadas aos ovócitos para que esses sejam capazes de formar embriões viáveis. Nesse sentido o presente estudo testou alterações no processo de maturação *in vitro* de ovócitos bovinos visando um incremento na produção e qualidade de embriões PIVE. A primeira tentativa de alteração do sistema para obter melhora na eficiência da MIV foi baseada no protocolo proposto por Albuz et al.(2010), em que as mudanças tentam simular os eventos que ocorrem na maturação *in vivo*. Assim, essas mudanças foram introduzidas no sistema de MIV utilizado no LRA. Entretanto, os resultados obtidos foram contrários aos relatados por Albuz et al. (2010), pois durante todo o desenvolvimento embrionário, o grupo submetido ao sistema SPOM mostrou-se inferior ao grupo controle tanto para a taxa de clivagem quanto para a de blastocisto em D6, D7 e D8. Ou seja, diferente do esperado, o sistema SPOM adaptado ao sistema MIV utilizado no LRA afetou drasticamente o desenvolvimento embrionário.

Esse sistema envolve duas etapas, a primeira consiste em curto período de tempo em se utiliza agentes moduladores de AMPc, causando um rápido aumento dos níveis intraovocitário, semelhante à ação do LH *in vivo*. Posteriormente, ovócitos são submetidos a uma fase de MIV prolongada, na presença da cilostamida, um inibidor da PDE 3, que retém a meiose, associada a uma concentração de FSH que deve superar o efeito do inibidor e induzir a retomada e término da meiose.

Uma possível explicação para os baixos resultados obtidos nessa adaptação do SPOM ao sistema de maturação *in vitro* utilizado no LRA seria que a dose utilizada de FSH não foi suficiente para superar o efeito inibitório da cilostamida e os ovócitos, então não teriam completado a meiose. Isso porque durante a fase de MIV estendida, a origem e concentração do FSH utilizado foram diferentes do utilizado por Albuz et al. (2010). No sistema do LRA é utilizado em uma concentração de 0,01UI/ml, ou seja, 10

vezes menor que a dose utilizada no trabalho original (0,1UI/ml). Além disso, o FSH de origem suína utilizado pode ter uma menor atividade do que o FSH recombinante utilizado no protocolo proposto. No SPOM, diferentemente da MIV utilizada rotineiramente, os ovócitos não maturam de forma espontânea e uma dose relativamente alta de FSH é requerida para contrapor os efeitos de inibição causada pela cilostamida (Albuz et al., 2010; Rose et al., 2012). Portanto, é possível que os ovócitos não conseguiram retomar e progredir na meiose, sendo que a grande parte dos que foram submetidos à FIV estariam retidos em VG ou em uma fase anterior à metáfase II.

Na tentativa de superar esse possível efeito inibitório da cilostamida, realizou-se o mesmo experimento anterior em que a concentração de FSH do foi 10 vezes maior do que o utilizado no experimento anterior. Além disso, foi também avaliado se esse sistema funcionaria de maneira diferente se ovócitos menos competentes fossem utilizados. O aumento na concentração de FSH não teve nenhum efeito na produção de embriões sendo os resultados semelhantes aos encontrados quando a menor concentração de FSH foi utilizada.

Albuz et al., (2010) hipotizaram que o sistema SPOM é capaz de melhorar a competência de desenvolvimento dos ovócitos de uma população heterogênea de folículos de ovários bovinos, como, por exemplo, folículos em atresia ou pequenos folículos antrais, que se encaixam na categoria de 1-3 mm, que foi utilizado em nosso experimento. Os resultados obtidos neste estudo discordam dessa hipótese, pois quando ovócitos comprovadamente menos competentes foram obtidos de folículos dissecados e medidos, nenhuma melhora foi observada na clivagem ou taxa de blastocisto. Resultados semelhantes foram encontrados por Rose et al. (2012), onde utilizaram ovócitos de fêmeas ovinas pré-púberes, em que a população de ovócitos é menos competente, não observaram um incremento na produção de embriões de ovócitos incompetentes submetidos ao sistema SPOM. A falta de relatos na literatura utilizando esse sistema dificulta a discussão das diferenças observadas entre os dois estudos, entretanto a diferença entre os protocolos pode ser responsável, visto que os meios, a atmosfera gasosa utilizada durante o cultivo e a origem do FSH, foram diferentes entre esses dois estudos.

Frente aos baixos resultados obtidos utilizando o sistema SPOM com adaptações às condições de MIV do LRA, realizou-se uma terceira etapa do experimento. Foram realizadas modificações de forma a tornar o SPOM o mais próximo possível do proposto por Albuz et al. (2010). O FSH de origem suína foi substituído pelo FSH

recombinante e utilizada condições de baixa tensão de O<sub>2</sub>, e a modificação da fonte proteica, substituindo do SFB pelo BSA- FAF. Foi observada uma redução nas taxas de produção de blastocisto do sistema SPOM realizado em baixa tensão de O<sub>2</sub>, independente da fonte de FSH utilizado, em relação ao controle. O sistema SPOM nas condições descritas por Albuz et al. (2010) não apresentou um incremento na produção de embriões *in vitro*, e não houve um aumento do tamanho dos embriões e no número de células. Resultados semelhantes foram observados por Bernal et al. (2011), que utilizando o sistema SPOM em ovócitos bovinos, relata que a taxa de blastocisto foi menor no SPOM que no grupo controle (22% vs 34%) e também não foi observado diferença no número de células dos embriões (125 e 128, respectivamente).

É interessante observar que os tratamentos que utilizaram a fonte de FSH recombinante, tanto em baixa e alta tensão, a produção de embriões foi menor em relação ao tratamento que utilizou a fonte de FSH de origem suína. Além disso, a presença de SFB no meio de cultivo não permitiu efeitos positivos adicionais do FSH recombinante, pois o soro é composto por diversas substâncias como proteínas, carboidratos, aminoácidos, fatores de crescimento e hormônios (Picton et al. 2008), além de ser uma fonte de precursores para a síntese de esteroides (Hulshof et al. 1995, Li et al., 2012).

Os dados obtidos nesse experimento corroboram com os dados obtidos em nosso laboratório, onde diferentes fontes proteicas (SFB e BSA) foram utilizadas, em combinação com esses dois tipos de FSH (recombinante ou suíno), onde o uso de FSH recombinante em altas concentrações prejudicou o desenvolvimento embrionário (Leme, 2013 dados não publicados). O FSH recombinante é obtido da tecnologia de DNA recombinante, a qual utiliza células de ovários de Hamsters. Ele é mais puro e homogêneo, o que pode propiciar uma alta eficácia nos resultados (Calder et al. 2003).

Uma possível hipótese que pode explicar as baixas taxas de produção obtidas em relação ao uso de FSH recombinante na metodologia SPOM é que os níveis necessários desta gonadotrofina podem diferenciar entre as espécies. Estudos conduzidos com vacas Brahman e Angus foram observados que as concentrações plasmáticas de FSH diferem entre *Bos indicus* e *Bos taurus*, onde o *Bos indicus* apresentou níveis plasmáticos de FSH mais baixos, podendo inferir que zebuínos possam ter uma maior sensibilidade frente à exposição dessa gonadotrofina (Alvarez et al., 2000).

Considerando que nenhum incremento foi obtido nos experimentos anteriores, foi então proposto um sistema alternativo. Foi realizada a inibição e, durante

esse período adicionado substâncias que pudessem auxiliar os ovócitos, tendo por objetivo melhorar a sua competência. Para a retenção foi escolhida a cilostamida na concentração de 20  $\mu$ M utilizada no sistema SPOM. Apesar de várias substâncias inibitórias terem sido testadas e demonstrado que não tem efeito prejudicial no desenvolvimento embrionário como a butirolactona-I e roscovitina (Adona & Leal, 2004, Barreto, 2008), a possibilidade do uso de inibidores específicos da PDE-3A fornece uma oportunidade para maior entendimento do mecanismo de maturação ovocitária (Thomas et al., 2002). A cilostamida como inibidor específico da PDE-3 inibe a degradação intraovocitária de AMPc e, portanto, retém a meiose agindo em uma etapa diferente dos outros inibidores. Apesar de alguns relatos de seu uso em ovócitos bovinos serem encontrados na literatura (Mayes & Sirard 2002; Thomas et al., 2002; Sasseville et al., 2009), o seu uso como inibidor para essa espécie não está bem estabelecida.

Desta forma, inicialmente foi avaliada a capacidade da cilostamida de manter a retenção meiótica, e foi observado que a mesma retém quase 100% dos ovócitos no estágio de VG até 24 horas. Resultados semelhantes foram encontrados em camundongos (Nogueira et al., 2006; Vanhoutte et al., 2008) e humanos (Vanhoutte et al. 2007). Entretanto, Mayes & Sirard, 2002, em ovócitos bovinos desnudos utilizaram inibidores da PDE e obtiveram uma taxa de apenas 68,1% de VG utilizando 20  $\mu$ M de cilostamida e, Shu et al., 2008 trabalhando com ovócitos humanos observaram que cerca de 60% dos ovócitos permaneceram bloqueados no estágio de VG. É importante observar que no último trabalho foi utilizado ovócitos de pacientes que receberam superestimulação ovariana e, portanto, alguns ovócitos já podem ter sido estimulados a retomar a meiose no momento da coleta.

Posteriormente, foi avaliado se o período de retenção (pré-maturação) afetaria a cinética da progressão da meiose. Essa avaliação foi realizada para determinar o momento mais apropriado para a fecundação. Sendo assim, os COCs foram submetidos a um período de retenção por 8 e 24 horas já na presença de cilostamida e ITS, pois esse seria o sistema a ser testado para a produção de embriões. Após a retenção foram maturados por 18 e 24 horas. Como esperado, no grupo controle houve um aumento na taxa de maturação nuclear quando os ovócitos permaneceram por 24 horas no cultivo, comparados com 18 horas. Entretanto, nos grupos em que os ovócitos foram retidos e posteriormente submetidos à maturação, a percentagem de ovócitos no estágio de metáfase II foi similar quando esses foram maturados por 18 ou 24 horas. Esses

resultados sugerem que houve uma aceleração na meiose, e que com 18 horas de maturação a maioria dos ovócitos já maturou independente do tempo de inibição. Esse resultado era esperado, pois outros autores já relataram uma aceleração da meiose após a inibição com butirolactona-I (Adona & Leal, 2004; Barreto, 2008). Parece que essa aceleração é devida à retenção *per se*, pois tem sido observado também quando outras drogas são utilizadas (Adona & Leal, 2004; Barreto, 2008). Entretanto, para a cilostamida esse tipo de comportamento da cinética de maturação nuclear ainda não foi relatado. Essa informação é fundamental, para que a FIV possa ser realizada no momento correto, evitando a fecundação de ovócitos envelhecidos, o que prejudicaria o desenvolvimento embrionário. Baseado nesses resultados, foi escolhido o tempo de 18 horas para realizar a FIV em ovócitos submetidos à pré-maturação.

Apesar da taxa de clivagem ser semelhante, os ovócitos maturados *in vitro* por 24 horas apresentaram maior ( $P < 0,01$ ) taxa de blastocisto em D6 e D7. Já os grupos submetidos à pré-maturação tiveram o seu desenvolvimento embrionário afetado ( $P < 0,05$ ) pelo período de pré-maturação, sendo que quanto maior o período de retenção maior o efeito prejudicial do tratamento na produção de embriões. Quanto à qualidade embrionária avaliada pelo número de células e tamanho do embrião, a qualidade embrionária foi afetada pelo tratamento quando submetida à retenção por 24 horas. O bloqueio meiótico visa manter os ovócitos em estágio de VG para que os mesmos tenham um tempo adicional para sofrer as modificações que ocorrem antes da maturação propriamente dita (Hyttel et al., 1997; Thomas et al., 2004) e adquirir maior competência para o desenvolvimento (Kubelka et al., 2000; Mermillod et al., 2000). Neste sentido, o ovócito pode ter a possibilidade de construir, modificar e armazenar novas proteínas, importantes para a competência de desenvolvimento.

Vários trabalhos que utilizaram a retenção em ovócitos bovinos com esse objetivo, apesar de não observarem um aumento significativo na produção de embriões (Adona & Leal, 2004; Sandri, 2007; Barreto, 2008; Gottardi, 2009), não relatam um efeito deletério. Com base nisso, adicionamos durante esse período a insulina-transferrina-selênio (ITS). A insulina exerce ações mitogênicas e antiapoptóticas (Spicer & Echternkamp, 1995; Lee et al., 2005), o selênio atua como estimulador da síntese de glutathiona peroxidase (GSH), (Zhang et al., 2006) e a transferrina como quelante dos radicais hidroxilas, facilitando o transporte de ferro e outros metais e agindo como fator de crescimento (Tatemoto et al., 2004). Portanto, a associação de insulina-transferrina-selênio (ITS) é um suplemento de escolha para promover o desenvolvimento de

ovócitos (Raghu et al., 2002) e rotineiramente utilizado em vários sistemas de MIV (Morató et al., 2010). Estudos prévios demonstram que o uso do ITS como agente oxidante é benéfico para o crescimento de folículos pré-antrais (Hammami et al., 2012) e conseqüentemente do ovócito durante a maturação *in vitro*.

Possivelmente as taxas reduzidas obtidas no desenvolvimento embrionário e na qualidade desses embriões produzidos estão ligadas à concentração da cilostamida utilizada somado ao período de exposição ao inibidor. Para verificar esse efeito, foi realizada uma segunda etapa do experimento com a metade da concentração de cilostamida. O grupo exposto por 24 horas ao inibidor e maturado na presença da metade da dose por 18 horas, apresentou um aumento de cerca de 10% na produção de embriões. Entretanto ao ser utilizada a metade da concentração, observou que foram melhores os resultados tanto para a pré-maturação por 8 e por 24 horas no que se diz a respeito ao desenvolvimento embrionário e qualidade embrionária, ressaltando que o grupo retido por 8 horas foi semelhante ao grupo controle 18 horas.

Experimentos anteriormente realizados para avaliar o efeito dose de cilostamida mostraram que doses menores são eficientes na retenção da meiose e não interferem no desenvolvimento embrionário. Como por exemplo, o uso de 1  $\mu\text{M}$  em ovinos (Rose et al., 2012), 10  $\mu\text{M}$  em bovinos (Luciano et al., 2011) e 0,1  $\mu\text{M}$  em camundongos (Nogueira et al., 2006). Especula-se também que pode haver uma possível interação na cinética da PDE em relação à concentração endógena de AMPc (Conti et al., 2002). Uma maior concentração de cilostamida pode impedir a correta degradação do AMPc intraovocitário.

Além disso, a presença de CC viáveis durante a MIV é importante para o sucesso da PIVE, sendo a ponte entre o ovócito e o ambiente *in vitro* (Tanghe et al., 2002). É importante a análise da viabilidade celular em diferentes momentos pelo fato de que as amostras biológicas sofrem danos de intensidades diferentes e em condições variadas de estresse, seja ele químico ou físico. Após a avaliação, não foi encontrado diferença na viabilidade de CC do grupo controle 18 horas e 24 horas ( $p > 0,05$ ).

Em relação aos grupos submetidos à inibição foi observado que independente do tempo de inibição, seja 8 ou 24 horas, as CC mantiveram-se viáveis. Entretanto, quando a inibição ocorreu por 24 horas, seguida de MIV por 18 horas, observou-se uma diferença significativa dos demais grupos, com 58% de CC viáveis.

Pereira et al. (2010) submeteu ovócitos bovinos a diferentes condições de MIV e avaliou as CC após o período de 24 horas, onde obteve mais de 80% de viabilidade



celular avaliados com azul de Trypan. Portanto, o efeito deletério da inibição, mesmo com metade da dose de cilostamida pode ser constatado pela viabilidade das CC após a MIV. A PDE 3 age somente no ovócito; se as CC apresentaram-se com baixa viabilidade é porque o ovócito já estava comprometido.

Para descartar que a inclusão do ITS possa estar envolvido no efeito deletério no grupo inibido por 24 horas, seguido de MIV por 18 horas, este foi retirado do meio de pré-maturação. Como esperado, os resultados obtidos no desenvolvimento embrionário e qualidade dos embriões produzidos, repetiu-se conforme o experimento anterior, onde os grupos de 8 e 24 horas de inibição, seguido de MIV por 18 horas foram semelhantes. Portanto, a presença do ITS no meio de pré-maturação não afetou o resultado.

O ITS tem sido utilizado em sistemas de MIV de ovócitos de várias espécies, como camundongos (De La Fuente et al., 1999), bovino (Córdova et al., 2010) e suíno (Wu et al., 2006; Jeong et al., 2008). E por seus efeitos benéficos, era esperado que o mesmo protegesse os ovócitos das possíveis injúrias que possam ser causadas durante a pré-maturação. De modo a fornecer condições adequadas para o desenvolvimento da competência, Adona et al. (2011) observaram que ovócitos submetidos ao cultivo de pré-maturação e durante a MIV com suplementos como a leptina a cisteamina e fatores neurotróficos derivados do cérebro – NBDF, não tiveram seu desenvolvimento embrionário afetado.

Portanto, mais estudos são necessários para a melhor utilização do sistema SPOM e da cilostamida como bloqueador da meiose, buscando melhorar a eficiência da maturação dos ovócitos bovinos *in vitro*, adicionando aditivos durante o período de bloqueio (antioxidantes, hormônios, fatores de crescimento ou fatores que estão envolvidos com a competência do ovócito) para o entendimento dos mecanismos envolvidos na maturação citoplasmática.

## 6. CONCLUSÕES

De acordo com os experimentos realizados neste trabalho pode-se concluir que:

- O sistema SPOM adaptado para o sistema de MIV quando utilizado em presença de FSHr, BSA e em baixa tensão de O<sub>2</sub> não aumentou a produção e qualidade de embriões produzidos *in vitro*.

- A cilostamida inibe a retomada da meiose em ovócitos bovinos por até 24 horas, sendo essa inibição reversível após 18 horas de maturação.

- O cultivo de pré-maturação em ovócitos bovinos utilizando cilostamida e ITS teve efeito prejudicial na produção e qualidade de embriões *in vitro*, esse efeito está relacionado à concentração de cilostamida e ao período de retenção.

- A presença de ITS durante o período de retenção não afetou o desenvolvimento embrionário.

- Mais estudos devem ser conduzidos para estabelecer a concentração adequada de ciclostamida para ovócitos bovinos e avaliar a adição de outras substâncias no cultivo de pré-maturação para melhorar a competência ovocitária.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADONA, P.R.; LEAL, C.L.V. Meiotic inhibition with different cyclindependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. **Zygote**, v. 12, p. 197-204, 2004.

ADONA, P.R.; LEAL, C.L.V. Effect of concentration and exposure period to butyrolactone I on meiosis progression in bovine oocytes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 354-359, 2006

ADONA, P. R.; PIRES, P. R.; QUETGLAS, M. D.; SCHWARZ, K. R.; LEAL, C. L. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Animal Reproduction Science**. v. 108, p. 49-65, 2008.

ADONA, P. R.; DE BEM, T.H.C.; MESQUITA, G.L.; ROCHETTI, R.C.; LEAL, C.L.V. Embryonic development and gene expression in oocytes cultured in vitro in supplemented pre-maturation and maturation media. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 31-38, 2011.

ALBUZ, F. K.; SASSEVILLE, M.; LANE, M.; ARMSTRONG, D. T.; THOMPSON, J. G. GILCHRIST, R. B. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction**, v.25, p. 2999-3011, 2010.

AKTAS, H.; WHELLER, M.B.; FIRST, N.L.; LIEBFRIED, M.L. Maintenance of meiotic arrest by increasing [cAMP] may have physiological relevance in bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.105, p. 237-245, 1995.

ALVAREZ, P.; SPICER, L.J.; CHASE, C.C.; PAYTON Jr., M.E.; HAMILTON, T.D.; STEWART, R.E.; HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; WETTERMANN, R.P. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman and Senepol cows in subtropical environment. **Jornal of Animal Science**, v. 78, p. 1291-1302, 2000.

BARRETO, L.S.S. **Avaliação dos efeitos da inibição da maturação nuclear e de antioxidantes sobre a maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário**. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, 2008. 74p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, 2008.

BARRETO, L.S.S.; CASTRO, V.S.D.C.; GARCIA, J.M.; MINGOTI, G.Z. Meiotic inhibition of oocytes bovines in medium supplemented with a serum replacer and hormones: effects on developmental capacity. **Zygote**, v. 19, p. 107-116, 2010.

BERNAL, S.M.; HEINZMANN, J.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; TIMMERMANN, B.; NIEMANN, H. Effects of different in vitro maturation systems on bovine embryo development. In: **Animal Reproduction Science**, resumo 196, IETS, 2011.

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.

CAIXETA, E.S.; DODE, M.A.N. Dissecção folicular: um método eficiente para estudos da competência ovocitária. **Série Documentos nº 260**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.

CALDER, M. D.; CAVENEY, A. N., SMITH, L. C.; WATSON, A. J. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 14, p.1-12, 2003.

CONTI M.; ANDERSEN C.B.; RICHARD F.; MEHATS C.; CHUN S.Y.;HORNER, K. et al. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, p. 153–159, 2002.

CÓRDOVA, B.; MORATÓ, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, T.; MOGAS, T. Effect of the addition of insulin-transferrin-selenium and/or L-ascorbic acid to the *in vitro* maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. **Theriogenology**, v. 74, p. 1371-1374, 2010.

DE LA FUENTE, R.; O'BRIEN, M.J.; EPPIG, J.J. Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. **Human Reproduction**, v. 14, p. 3060–3068, 1999.

DODE, M.A.N.; ADONA, P.R. Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6- dimethylaminopurine. **Animal Reproduction Science**, v. 65, p. 171-180, 2001.

FAGUNDES, N.S.; MICHALCZECHEN-LACERDA, V.A.; CAIXETA, E. S.; MACHADO.G.M.; RODRIGUES, F.C.; MELO, E.O.; DODE, M.A.N.; FRANCO, M.M. Methylation status in the intragenic differentially methylated region of the IGF2 locus in *Bos taurus indicus* oocytes with different developmental competencies. **Molecular Human Reproduction**, v. 17, p. 85-91, 2011.

GILCHIST, R.B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v.67, p. 6-15, 2007.

GOTARDI, F.P. **Inibição da maturação nuclear pela butirolactona I durante o transporte de oócitos bovinos destinados à produção in vitro de embriões (PIV).**

Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, 2009. 74p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, 2009.

HAMMAMI, S.; MORATÓ, R.; ROMANGUERA, R.; ROURA, M.; CATALÁ, M.G.; PARAMIO, M.T.; MOGAS, T.; ISQUIERDO, D. Developmental Competence and Embryo Quality of Small Oocytes from Pre-pubertal Goats Cultured in IVM Medium Supplemented with Low Level of Hormones, Insulin–Transferrin–Selenium and Ascorbic Acid. **Reproduction in Domestic Animals**. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02160.x, 2012.

HOLM, P.; SHUKRI, N. N.; VAJTA, G.; BOOTH, P.; BENDIXEN, C.; CALLESEN, H. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. **Theriogenology**, v. 50, p. 1285-99, 1998.

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

HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; BECKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; VAN DER DONK, J. A. ; VAN DEN HURK, R. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17- $\beta$ estradiol on the culture of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.44, p. 217-226, 1995.

JEE, B.; CHEN, H.Y.; CHENG, R.; CHIAN, R.C. Effect of a phosphodiesterase type 3 inhibitor in oocyte maturation medium on subsequent mouse embryo development. **Fertility and Sterility**, v. 91, p. 2037-2042, 2009.

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

KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R.M.; PAVLOK, A. Butirolactone-I reversibility inhibits of bovine oocytes without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 292-302, 2000.

LI, J.; MAO, G.; XIA, G. FSH modulates PKA I and GPR3 activities in mouse oocyte of COC in a Gap Junctional Communication (GJC)- dependent manner to initiate meiotic resumption. **PLOS ONE**. Doi: 10.1371/journal.pone.0037835, 2012.

LEE, M.S.; KANG, S.K.; LEE, B.C.; HWANG, W.S. (2005). The beneficial effects of insulin and metformin on *in vitro* developmental potential of porcine oocytes and embryos. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 1264–1268.,2005.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; CAROLAN, C.; MERMILLOD, P. Bovine blastocyst production in vitro after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, p. 355-365, 1997.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; KHATIR, H.; CESARONI, G.; MERMILLOD, P. 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. DINNYES, A.; FAIR, T.; YANG, X.; BOLAND, M. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butirolactone-I. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, p. 204-209, 2001.

LONERGAN, P.; WOODS, A.; FAIR, T.; CARTER, F.; RIZOS, D.; WARD, F.; QUINN, K.; EVANS, A. effect of embryo source and recipient progesterone environment on embryo development in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 861-868, 2007.

LUCIANO, A.; POCAR, P.; MILANESI, E.; MODINA, S.; RIEGER, D.; LAURIA, A.; GANDOLFI, F. Effect of different levels of intracellular cAMP on the in vitro

maturation of cattle oocytes and their subsequent development following in vitro fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v. 54, p. 86-91, 1999.

LUCIANO, A.; MODINA, S.; VASSENA, R.; MILANESI, E.; LAURIA, A.; GANDOLFI, F. Role of intracellular cyclic adenosine 3',5' monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during in vitro maturation of bovines. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 465-472, 2004.

LUCIANO, A.; FRANCIOSI, F.; MODINA, S. C.; LODDE, V. Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP dependent mechanism(s). **Biology of Reproduction**, v. 85, p. 1252-1259, 2011.

MACHADO, G.M. **Efeito de diferentes protocolos de percoll na qualidade espermática e na produção in vitro de embriões**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2009. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2009.

MAYES, M.A.; SIRARD, M.A. Effect of type 3 and type 4 phosphodiesterase inhibitors on the maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest. **Biology of Reproduction**, v. 66, p.180–184, 2002.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibitor of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction**, v.55, p. 89-95, 2000.

NOGUEIRA, D.; CORTVRINDT, R.; DE MATOS, D.G.; VANHOUTTE, L.; SMITZ, J. Effect of phosphodiesterase type 3 on developmental competence of immature mouse oocyte in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 2045-2052, 2003.



NOGUEIRA D.; ALBANO, C.; ADRIAENSSENS, T.; CORTVRINDT, R.; BOURGAIN, C.; DEVROEY, P.; SMITZ, J. Human oocytes reversibly arrested in prophase I by phosphodiesterase type 3 inhibitor in vitro. **Biology of Reproduction**. v. 69, p. 587-592, 2004.

NOGUEIRA, D. RON-EL, R.; FRIEDLER, S.; SCHACHTER, M.; RAZIEL, A.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. Meiotic arrest by phosphodiesterase type 3 enhances maturatt in vitro capacity of human oocytes and allow subsequent embryonic development. **Biology of Reproduction**. v. 74, p. 177-184, 2006.

OLIVEIRA E SILVA, I. **Inibição e reversão da maturação nuclear, avaliação da maturação citoplasmática e produção de esteróides em complexos cumulus-oophorus bovinos co-cultivados com hemi-seções foliculares em meio de cultivo definido**. Brasília: Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, 2008. 84p. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, 2008.

OLIVEIRA E SILVA, I.; VASCONCELOS, R.B.; CAETANO, J.V.O.; GOULART, L.V.M.; CAMARGO, L.S.A.; BÁO, S.N.; ROSA E SILVA, A.A. Induction of reversible meiosis arrest of bovine oocytes using a two step procedure under defined and non-defined conditions. **Theriogenology**, v. 75, p. 1115-1124, 2011.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim up or percoll method on success in vitro fertilization and early embrionic development. **Theriogenology**, v. 44, p. 859-869, 1995.

PICTON, H.M.; HARRIS, S.E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E.L. The in vitro growth and maturation of follicles. **Reproduction**, v. 136, p. 703–715, 2008.

RAGHU, H.M.; NANDI, S.; REDDY, S.M. Effect of insulin, transferrin and selenium and epidermal growth factor on development of buffalo oocytes to the blastocyst stage in vitro in serum-free semidefined media. **Veterinary Record**, v. 151, p. 260-265, 2002.

ROSE, R.D.; GILCHRIST, R.B.; KELLY, J.M.; THOMPSON, J.G.; SUTTON MCDOWALL, M.L. Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators, **Theriogenology**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.09.020>, 2012.

SASSEVILLE, M.; ALBUZ, F.K.; CÔTÉ, N.; GUILLEMETTE, C.; GILCHRIST, R.B.; RICHARDS, F. Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 415-425, 2009.

SANDRI, L.R. **Efeito de bloqueadores meióticos na maturação e ultra-estrutura de oócitos e sua consequência na produção de embriões in vitro**. Santa Maria: Faculdade de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, 2007. 57p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

SHIMADA, M.; NISHIBORI, M.; ISOBE, N.; KAWANO, N.; TERADA, T. Luteinizing hormone receptor formation in cumulus cells surrounding porcine oocytes and its role during meiotic maturation of porcine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 484-491, 2003.

SHU, Y. M.; ZENG, H. T.; REN, Z.; ZHUANG, G. L.; LIANG, X. Y.; SHEN, H. W.; YAO, S. Z.; KE, P. Q.; WANG, N. N. Effects of cilostamide and forskolin on the meiotic resumption and embryonic development of immature human oocytes. **Human Reproduction**, v. 23, p. 504-513, 2008.

SPICER, L.J.; ECHTERNKAMP, S.E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.12, p. 223– 245, 1995

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUYNCK, H.; CORYN, M.; KRUIF, A. Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, p. 414-424, 2002.

TATEMOTO, H.; MUTO, N.; SUNAGAWA, I.; SHINJO, A.; NAKADA, T. Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during *in vitro*

maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1150–1157, 2004.

TRIPATHI, A.; KUMAR, K. V.; CHAUBE, S. K. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. **Journal of Cellular Physiology**. v. 223, p. 592-600, 2010.

THOMAS, R. E.; THOMPSON, J.; ARMSTRONG, C. G.; GILCHRIST, R. B. Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during in vitro maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1142-1149, 2002.

THOMAS, R. E.; THOMPSON, J.; ARMSTRONG, C. G.; GILCHRIST, R. B. Bovine *cumulus*-cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response of cell-specific cyclic adenosine 3', 5'- monophosphate cyclic levels. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 548-556, 2004.

VANHOUTTE, L.; De SUTTER, P.; NOGUEIRA, D.; DHONT, J.G.M.; VAN Der ELST, J. Nuclear and cytoplasmic maturation of in vitro matured human oocytes after temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor. **Human Reproduction**, v. 22, p. 1239–1246, 2007.

VANHOUTTE, L.; NOGUEIRA, D.; GERRIS, J. DHONT, M.; DE SUTTER, P. Effect of Temporary Nuclear Arrest by Phosphodiesterase 3-Inhibitor on Morphological and Functional Aspects of In Vitro Matured Mouse Oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.75, p. 1021–1030, 2008.

YEO, C.; GILCHRIST, R.B.; LANE, M. Disruption of bidirectional oocyte-*cumulus* paracrine signaling during in vitro maturation reduces subsequent mouse oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 1072-1080, 2009.

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

ZHANG, J.; ROBINSON, D.; SALMON, P. A novel function for selenium in biological system: selenite as a highly effective iron carrier for Chinese hamster ovary cell growth and monoclonal antibody production. **Biotechnology Bioengineer**, v. 95, p. 1188 – 1197, 2006.