



---

**Universidade de Brasília**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**INGRID DE OLIVEIRA E SILVA**

**AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA DE OÓCITOS  
BOVINOS EM SISTEMAS DE CULTURA DEFINIDOS**

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**BRASÍLIA/ DF**

**AGOSTO/2013**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA**

**INGRID DE OLIVEIRA E SILVA**

**AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA DE OÓCITOS  
BOVINOS EM SISTEMAS DE CULTURA DEFINIDOS**

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

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

**BRASÍLIA/DF  
AGOSTO/2013**

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Oliveira e Silva, I

Avaliação da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos em sistemas de cultura definidos.

Ingrid de Oliveira e Silva; orientação de Alzira Amélia Martins Rosa e Silva. – Brasília, 2013.

98p.: il.

Tese de Doutorado (D) – Universidade de Brasília/Faculdade de Medicina, 2013.

1. Maturação *in vitro*. 2. Competência oocitária. 3. Biotecnologia. I. Rosa e Silva AAM.

**REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

Oliveira e Silva, I. Avaliação da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos em sistemas de cultura definidos. Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2013, 98 p. Tese de Doutorado.

**CESSÃO DE DIREITOS**

NOME DO AUTOR: Ingrid de Oliveira e Silva

TÍTULO DA TESE DE DOUTORADO: Avaliação da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos em sistemas de cultura definidos.

GRAU: Doutora      Ano: 2013

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

Ingrid de Oliveira e Silva

CPF: 046.021.936-76

Endereço: Rua Professor Walter Miranda, 78 Benfica

CEP- 36090-520- Juiz de Fora/ MG- Brasil

Tel: (32) 3222-2677 E-mail: ingridida2004@yahoo.com.br

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA**

**INGRID DE OLIVEIRA E SILVA**

**Avaliação da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos em sistemas de cultura definidos.**

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS A  
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTORA EM CIÊNCIAS MÉDICAS NA ÁREA DE  
CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIAS MÉDICAS  
APROVADA POR:**

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

**ANGÉLICA AMORIM AMATO UnB  
(EXAMINADORA INTERNA)  
angelicamato@hotmail.com**

**HÉLIO BLUME UPIS  
(EXAMINADOR EXTERNO)  
helio@upis.br**

**LOISE PEDROSA SALLES UnB  
(EXAMINADOR INTERNO)  
loise@unb.br**

**CHARLES ANDRÉ SOUZA BISPO IFMG  
(EXAMINADOR EXTERNO)  
charles.bispo@ifmg.edu.br**

**BRASÍLIA/DF 14 DE AGOSTO DE 2013.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos concedidas a mim.

À Professora Alzira, pelos ensinamentos tanto de cunho científico quanto pessoal que possibilitaram tantas oportunidades na minha vida.

Aos meus pais, André e Nelcy, pelo amor, carinho e educação que me deram a base para eu chegar até aqui.

Ao meu amor Rodrigo, por todo apoio, paciência, amor e por me fazer muito feliz.

Aos meus familiares e amigos pelo incentivo e força que me impulsionaram nos momentos mais difíceis.

A todos do Laboratório para Estudo da Reprodução- UnB, em especial, Gustavo, Dany Kaiser, Dany Cris, Flávia, Camila, Valter e Cilene pela amizade e por me ajudarem na execução desse trabalho.

Ao Dr. Luís Sérgio, pela oportunidade de realizar as análises moleculares na Embrapa Gado de Leite, e à Michele Munck por me ajudar na execução dos experimentos.

À Professora Sônia Bão, por disponibilizar o laboratório de Microscopia Eletrônica e à Ingrid Gracielle, por me ajudar com os cortes ultrafinos.

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

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

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

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

## LISTA DE ABREVIATURAS

AI – Anáfase I  
ATP – Adenosina trifosfato  
BSA – Albumina sérica bovina  
cAMP – Adenosina monofosfato cíclico  
CC – Células do *cumulus*  
CG – Células da granulosa  
CCO ou COC – Complexo *cumulus oophorus*  
CSF – Fator citostático  
CT – Células da teca  
Cx 43 – Conexina 43  
6- DMAP – 6-Dimethylaminopurina  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DRB – 5,6-dicloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole  
EGF – Fator de crescimento epidermal  
PvS – Espaço perivitelínico  
E2 – 17 $\beta$  estradiol  
FF – Fluido folicular  
FSH – Hormônio folículo estimulante  
GC – Grânulo cortical  
GDF9 – Fator de crescimento e diferenciação 9  
GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase  
GV – Vesícula germinativa  
GVBD – Quebra da vesícula germinativa  
HS – Hemi-seções foliculares  
HSP70 – Heat Shock Protein 70  
IGF-I – Fator de crescimento semelhante a insulina tipo I  
IGFIR – Receptor de IGFI  
LH – Hormônio luteinizante  
Mv – Microvilosidades  
MAPKs – Proteínas quinases ativadoras de mitógenos  
MEK – Quinase específica da MAPK  
MI – Metáfase I

MIV – Maturação *in vitro*  
MII – Metáfase II  
*mos* – Proto - oncogene  
MPF – Fator promotor da maturação  
mRNA – RNA mensageiro  
OMI – Inibidor da maturação do oócito  
PBI – Primeiro corpúsculo polar  
PIVE – Produção *in vitro* de embriões  
PKA – Proteína quinase A  
PRDX1– Perodoxirredoxina 1  
PVA – Álcool polivinílico  
PI – Prófase I  
P34 CDC2 – Subunidade catalítica do MPF  
P4 – Progesterona  
Rh-FSH – FSH recombinante humano  
RNA – Ácido ribonucleico  
SFB – Soro fetal bovino  
TI – Telófase I  
ZP – Zona pelúcida

## LISTA DE FIGURAS

Esquema 1. Mecanismo de regulação da maturação nuclear.	10
Esquema 2. Regulação do diálogo entre as células do <i>cumulus</i> e o oócito.	11
Figura 1. Configurações cromossômicas da meiose.	31
Fig. 2. A) Estágio da maturação nuclear de CCOs bovinos cultivados em meio de maturação controle por 24h, ou em MIV-B por 24, 32, 40 e 48h. B) Estágio da maturação nuclear de CCOs bovinos cultivados em meio de maturação controle por 24h, ou em MIV-C por 24, 32, 40 e 48h.	37
Fig. 3. Estágio da maturação nuclear de CCOs bovinos cultivados por 24h (A), 32 (B), 40 (C) e 48h (D) em MIV-B ou MIV-C.	39
Fig. 4. Ultra-estrutura de CCOs bovinos imaturos (0h)- Fig. a-e; e cultivados em meio de maturação padrão por 24h (T24)- Fig. f e g.	42
Fig. 5. Ultra-estrutura de CCOs bovinos cultivados em MIV-B por 24h (B24).	43
Fig. 6. Ultra-estrutura de CCOs bovinos cultivados em MIV-B por 48h (B48).	44
Fig. 7. Ultra-estrutura de CCOs bovinos cultivados em MIV-C por 24h (C24).	45
Fig. 8. Ultra-estrutura de CCOs bovinos cultivados em MIV-C por 48h (C48).	46
Fig. 9. Abundância relativa do gene <i>HSP70.1</i> em oócitos bovinos cultivados em MIV-C.	49
Fig. 10. Abundância relativa do gene <i>PRDX1</i> em oócitos bovinos cultivados em MIV-C.	50
Fig. 11. Abundância relativa do gene <i>IGF1R</i> em oócitos bovinos cultivados em MIV-C.	51
Fig. 12. Abundância relativa do gene <i>GDF9</i> em oócitos bovinos cultivados em MIV-C.	52
Fig. 13. Abundância relativa do gene <i>HSP70.1</i> em oócitos bovinos cultivados em MIV-B.	54
Fig. 14. Abundância relativa do gene <i>PRDX1</i> em oócitos bovinos cultivados em MIV-B.	55
Fig. 15. Abundância relativa do gene <i>IGF1R</i> em oócitos bovinos cultivados em MIV-B.	56
Fig. 16. Abundância relativa do gene <i>GDF9</i> em oócitos bovinos cultivados em MIV-B.	57



## LISTA DE TABELAS

Tabela1. Sequência dos *primers* específicos, temperaturas de pareamento, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no GeneBank 34

Tabela 2. Características ultra-estruturais de CCOs bovinos imaturos e CCOs cultivados por 24h em meio de maturação controle (T24) ou por 24 ou 48h em MIV-B ou MIV-C. 41

## LISTA DE ANEXOS

- Anexo A. Artigo publicado: OLIVEIRA e SILVA, I.; VASCONCELOS, R.B.; CAETANO, J.V.; GULART, L.V.M.; CAMARGO, L.S.A.; BAO, S.N.; ROSA e SILVA, A.A.M. Induction of reversible meiosis arrest of bovine oocytes using a two-step procedure under defined and non defined conditions.. **Theriogenology**, 75: 1115-1124, 2011. 86
- Anexo B. Formulação comercial do Minimum Essential Medium (MEM) Alpha Medium 96

## **Avaliação da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos em sistemas de cultura definidos.**

### **RESUMO**

O objetivo foi avaliar o efeito de sistemas de cultura definidos na maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos utilizando um procedimento em duas etapas: inibição e a subsequente retomada do bloqueio meiótico. Na primeira etapa os CCOs foram cultivados em meio controle, MIV-B ou MIV-C por 24h. Na segunda etapa, o cultivo continuou até 32, 40 ou 48 horas para os CCOs cultivados em MIV-B ou MIV-C para avaliação tempo-dependente do estágio da meiose dos oócitos. O meio controle utilizado foi TCM-199 suplementado com SFB e FSH. Já MIV-C foi constituído por meio Alpha –MEM suplementado com PVA, insulina, IGF-I, androstenediona, aminoácidos não essenciais, transferrina e selênio, e a constituição de MIV-B foi semelhante à de MIV-C, porém sem a adição dos hormônios e fator de crescimento. A maturação citoplasmática foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) nos tempos de 0, 24 e 48h de cultivo e também pela expressão dos genes HSP70.1, PRDX1, GDF9 e IFF1R. Os resultados mostraram que tanto MIV-C quanto MIV-B inibiram a meiose em cerca de 70% dos CCOs cultivados por 24h. Nas 24h de cultivo subsequentes, apenas 30% dos CCOs cultivados em MIV-C alcançaram o estágio maduro (MII). Já MIV-B apresentou cerca de 50% dos CCOs em MII após 32h de cultivo. Ao microscópio eletrônico o grupo controle apresentou características de maturação tais como a presença de espaço perivitelínico (PvS) desenvolvido, microvilosidades (Mv) eretas, grânulos corticais (GC) alinhados à membrana plasmática e mitocôndrias dispersas pelo citoplasma. O grupo 0h apresentou características de imaturidade como pequeno PvS, Mv deitadas, GC em grumos e mitocôndrias no córtex do oócito. Os sistemas de cultura definidos proporcionaram, no entanto a presença de características intermediárias entre o grupo 0h e o grupo controle, como as Mv eretas em 83,3% dos CCOs, presença de mitocôndrias ligeiramente dispersas pelo citoplasma e GC se alinhando à membrana plasmática em 50% dos CCOs cultivados em MIV-C, apesar do bloqueio da meiose. Após 24h de cultivo em MIV-B foram observadas algumas características de maturação semelhantes ao controle maduro, como o alinhamento dos GC e a dispersão das mitocôndrias ( $p < 0,05$ ). As Mv ficaram num estágio intermediário e o PvS seguiu o padrão imaturo ( $p < 0,05$ ). Com 48h de cultivo nenhum outro avanço foi observado para os CCOs cultivados em MIV-B. O cultivo por 48h com MIV-C, no entanto promoveu a dispersão das mitocôndrias e o alinhamento dos GC como no controle maduro ( $p < 0,05$ ). Para a quantificação da expressão gênica por real-time-PCR, os oócitos cultivados nos meios descritos acima foram separados após 24 ou 48h de cultivo em oócitos com (CP) e sem corpúsculo polar (SCP), ou maduros e imaturos respectivamente. Oócitos

frescos (0h) foram usados como controle imaturo. O resultado da quantificação da expressão dos genes em geral mostrou que tanto o cultivo com MIV-C, quanto o cultivo com MIV-B apresentou os oócitos imaturos com maior abundância relativa que os oócitos maduros, sendo que a quantificação dos oócitos maduros foi igual ao controle maduro (TCM-199) e a quantificação dos oócitos imaturos foi semelhante ao controle imaturo (0h). As exceções a essa regra foram: O grupo C48SCP (oócitos sem CP cultivados por 48h em MIV-C) para o gene PRDX1, apresentou-se semelhante ao controle maduro ( $p < 0,05$ ); o grupo B24CP (oócitos com CP cultivados por 24h em MIV-B) apresentou maior abundância relativa que o controle maduro para os genes PRDX1 e HSP70.1. Com relação ao gene GDF9, o cultivo dos CCOs por 24h tanto em MIV-B, quanto em MIV-C promoveu maior abundância relativa nos grupos maduros cultivados por 24h (B24CP e C24CP), quando comparados ao controle maduro ( $p < 0,05$ ). A abundância relativa do gene IGFIR não apresentou diferença significativa após o cultivo em MIV-C. No entanto, na comparação da quantificação desse gene após o cultivo em MIV-B por 24h foi observado que o controle maduro apresentou menor abundância relativa do que os demais grupos ( $p < 0,05$ ). No presente estudo, concluiu-se que o cultivo de CCOs em MIV-B ou MIV-C, por se tratar de dois meios estritamente definidos e que, portanto permitem a obtenção de respostas consistentes, constituem bons modelos para o estudo dos eventos que ocorrem durante a maturação oocitária sem necessidade do uso de inibidores da meiose. A manutenção dos CCOs em estágio imaturo *in vitro* sem qualquer efeito prejudicial pode ser usada para fornecer tempo adicional para estudar o processo de sincronização entre a maturação citoplasmática e nuclear durante a MIV.

Palavras-chave: bovinos, oócitos, maturação citoplasmática, maturação nuclear, meio quimicamente definido.

## **Evaluation of nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes in defined culture systems.**

### **ABSTRACT**

The objective was to evaluate the effect of defined culture systems on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes using a two-step procedure: inhibition and the subsequent resumption of meiotic arrest. In the first step the CCOs were cultured in control medium, MIV-B or MIV-C for 24h. In the second step, the culture continued until 32, 40 or 48 hours for the CCOs cultivated in MIV-B or MIV-C for the time-dependent evaluation of oocytes meiosis stage. The control medium used was TCM-199 supplemented with FCS and FSH. The MIV-C constitution was MEM-Alpha Medium supplemented with PVA, insulin, IGF-I, androstenedione, non-essential amino acids, transferrin and selenium, and the MIV-B constitution was similar to MIV-C, but without the addition of hormones and growth factor. The cytoplasmic maturation was evaluated by transmission electron microscopy (TEM) at 0, 24 and 48 h of cultivation, and by gene expression (HSP70.1, PRDX1, GDF9 and IFF1R). The results showed that MIV-C and MIV-B inhibited the meiosis in about 70% of the CCOs cultivated by 24h. In the subsequent 24h of culture, only 30% of MIV-C CCOs reached the mature stage (MII). MIV-B already has filed about 50% of the CCOs in MII after 32 h of culture. The control group presented ultrastructural characteristics of maturation such as the presence of conspicuous perivitelline space (PvS), erect microvilli (Mv), aligned cortical granules (CG) and spread mitochondria through the cytoplasm. The 0h group has shown characteristics of immaturity as small PvS, bent Mv, clusters of CG and cortical mitochondria. Defined culture systems provided, however the presence of intermediate characteristics between the 0h group and the control group, as the erect Mv in 83.3% of CCOs, the presence of mitochondria cortical/evenly distributed by cytoplasm and aligned/cluster GC in 50% of CCOs cultivated in MIV-C, despite the meiosis arrest. After MIV-B culture for 24h were observed some maturation characteristics similar to control group, as the alignment of the CG and the spread mitochondria ( $p < 0.05$ ). The Mv were in an intermediate stage and the PvS followed the immature pattern ( $p < 0.05$ ). With 48h of culture no other advance was observed for the CCOs cultivated in MIV-B. The culture for 48 h with MIV-C, however promoted the dispersion of mitochondria and the alignment of the GC as in mature control ( $p < 0.05$ ). For the quantification of gene expression by real-time-PCR, the oocytes cultured in the media described above were separated after 24 or 48h of culture in oocytes with (PB) and without polar body (WPB), or mature and immature respectively. Fresh oocytes were used as immature control. The result of the quantification of gene expression in general showed that MIV-C and MIV-B culture presented the immature oocytes with greatest relative abundance that the mature oocytes, and the

quantification of mature oocytes was equal to the mature control (TCM-199) and the quantification of immature oocytes was similar to the immature control. The exceptions to this rule were: the C48WPB Group (oocytes without PB cultured for 48 hours MIV-C) for PRDX1 gene appeared similar to mature control ( $p < 0.05$ ); the B24PB Group (oocytes with PB cultivated in MIV-B for 24h) showed higher relative abundance for PRDX1 and HSP 70.1.genes than the mature control. With respect to GDF9, 24h of culture in MIV-B or MIV-C promoted greater relative abundance in mature groups (B24PB and C24PB), than the mature control ( $p < 0.05$ ). The relative abundance of IGFIR gene showed no significant difference after cultivation in MIV-C. However, the quantification of this gene after 24h of culture in MIV-B showed lower relative abundance in mature control group than the other groups ( $p < 0.05$ ). In the present study, it was concluded that MIV-B and MIV-C, can be used in lieu of meiosis inhibitors and furthermore, can provide extra time to study nuclear and cytoplasmic maturation synchrony of IVM.

**Key words:** bovine, oocytes, cytoplasmic maturation, nuclear maturation, chemically defined medium.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. OBJETIVOS</b>	3
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b>	4
<b>3.1. Maturação oocitária</b>	4
3.1.1. <i>Maturação in vivo x in vitro</i>	4
3.1.2. <i>Maturação Nuclear</i>	6
3.1.3. <i>Maturação citoplasmática</i>	12
3.1.3.1 <i>Modificações ultraestruturais no oócito durante a foliculogênese</i>	13
3.1.3.2. <i>Maturação Molecular</i>	14
3.1.3.2.1 <i>Genes escolhidos para avaliação da base molecular da maturação de CCOs cultivados em meio complexo e definido</i>	15
<b>3.2. Condições de cultivo</b>	16
<b>3.3. Mecanismos de inibição da retomada da meiose</b>	18
<b>3.4. Justificativa</b>	26
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	29
<b>4.1. Coleta e manipulação dos ovários</b>	29
<b>4.2. Recuperação dos oócitos</b>	29
<b>4.3. Composição dos meios de maturação <i>in vitro</i></b>	30
<b>4.4. Avaliação da maturação nuclear</b>	30
<b>4.5. Avaliação da maturação citoplasmática por microscopia eletrônica de transmissão</b>	31
<b>4.6. Avaliação da expressão gênica em CCOs cultivados em MIV-C ou MIV-B</b>	32
4.5.1. <i>Extração do RNA total e transcrição reversa</i>	32
4.5.2. <i>PCR em tempo real</i>	33
<b>4.6. Delineamento experimental</b>	34
<b>4.7. Análise estatística</b>	36
<b>5. RESULTADOS</b>	37
<b>6. DISCUSSÃO</b>	58
<b>6.1. Maturação nuclear</b>	58
6.2. <i>Maturação citoplasmática</i>	61
6.2.1. <i>Rearranjo de organelas citoplasmáticas</i>	61
6.2.2. <i>Expressão de genes de interesse</i>	64
<b>7. CONCLUSÃO</b>	68
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	70

## 1. INTRODUÇÃO

As condições de cultivo no que diz respeito às biotecnologias da reprodução ainda não chegaram ao patamar de mimetizar em laboratório as condições encontradas *in vivo* e acabam por gerar situações indesejáveis como, por exemplo, a perda da sincronização entre a maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos, alterações epigenéticas nos embriões e com isso diminuição da taxa de sucesso na PIVE (MACHALKOVA *et al*, 2004; BLANCO *et al*, 2011).

A maturação oocitária é um dos gargalos para o sucesso da reprodução, ou seja, a formação de um novo ser vivo, pois é através dela que o oócito se torna competente para ser fertilizado, e suportar o desenvolvimento embrionário inicial (BREVINI-GANDOLFI & GANDOLFI, 2001). No entanto a maturação é um processo complexo que envolve a maturação do núcleo, a maturação do citoplasma do oócito e o perfeito sincronismo entre elas (SANCHEZ & SMITZ, 2012).

Merecem destaque, portanto, estudos que focalizam esse processo tão importante para a geração de embriões viáveis de forma a promover a geração de nascimentos a termo no final do processo reprodutivo. O conhecimento das principais etapas desse processo e dos seus complexos mecanismos levará a uma produção animal à menor custo, a prevenção da extinção de várias espécies, além de possibilitar a perpetuação de genes de alto valor comercial ou biológico.

A maturação *in vitro* (MIV) tem a capacidade de aumentar o potencial reprodutivo uma vez que os ovários de um animal em idade reprodutiva a cada ciclo estral/menstrual estão repletos



de folículos imaturos que não serão ovulados por não se tratarem do folículo dominante, e que então irão entrar em atresia após a ovulação. A MIV permite também a redução de custos nas pesquisas de biotecnologias reprodutivas por podermos recorrer a ovários de abatedouro para obtenção de oócitos. Além disso, a MIV em humanos permite que pacientes que não podem passar pelo processo de estimulação hormonal ovariana tenham uma chance de recorrer à reprodução assistida.

Devido à obtenção de oócitos de folículos imaturos, e que, portanto ainda não são competentes para suportar o desenvolvimento inicial até que haja a ativação do genoma embrionário, torna-se necessário que o processo de maturação *in vitro* dê condições para a obtenção de competência oocitária (BREVINI-GANDOLFI & GANDOLFI, 2001).

A remoção do oócito do folículo ovariano resulta na retomada espontânea da meiose pelo oócito, ou seja, o oócito se torna maduro do ponto de vista nuclear (PINCUS & ENZMANN, 1935). No entanto, esse fato leva a inibição da maturação citoplasmática uma vez que esta só ocorre quando o oócito está em GV (vesícula germinativa, do inglês- germinal vesicle), devido ao estágio descondensado dos cromossomos. Observa-se então, uma perda na sincronia entre maturação citoplasmática e nuclear, o que influencia negativamente a aquisição de competência oocitária e provavelmente promove a reduzida taxa de produção de embriões *in vitro* (SANCHEZ & SMITZ, 2012).

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

No presente trabalho, na tentativa de melhorar as condições de maturação *in vitro* de oócitos bovinos, meios de cultivo totalmente definidos, ou seja, com todos os componentes conhecidos devido à ausência de soro em sua constituição, foram utilizados para o cultivo de complexos *cumulus oophorus* (CCOs) bovinos por até 48h e então avaliados em relação à sua atuação na promoção da maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos.

## 2. OBJETIVOS

### GERAL

Análise da maturação *in vitro* de CCOs bovinos cultivados em sistema de cultura definido (MIV-B e MIV-C).

### ESPECÍFICOS

- 1- Análise tempo-dependente da maturação nuclear de CCOs bovinos cultivados por 48 horas nos meios MIV-C e MIV-B;
- 2- Análise da maturação citoplasmática, por meio de microscopia eletrônica, dos CCOs após 24 e 48 horas de cultivo em MIV-C e MIV-B;
- 3- Análise da expressão de genes relacionados ao estresse térmico (HSP70.1) e oxidativo (PRDX1) e genes relacionados à competência oocitária (GDF9, IGF1R), dos CCOs após o cultivo em MIV-C e MIV-B.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Maturação oocitária

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

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) envolve três etapas distintas: a maturação (MIV), a fertilização (FIV) e o cultivo (CIV) *in vitro*, sendo que a seleção de gametas de qualidade é um dos principais eventos para o sucesso reprodutivo.

No procedimento *in vitro*, a ausência de uma seleção rigorosa associada a condições subótimas de cultivo promove um decréscimo na qualidade dos embriões produzidos (BLANCO *et al*; 2011). Apesar dos esforços para se melhorar os resultados da PIVE, sua taxa ainda é baixa. Somente 30-40% dos oócitos maturados *in vitro* chegam ao estágio de blastocisto (SIRARD *et al*, 2006), o que mostra a redução na aquisição de competência após o cultivo *in vitro*. Já na produção de embriões *in vivo*, aproximadamente 81% dos oócitos ovulados se desenvolvem em embrião até o 13º dia da fecundação quando avaliados pela taxa de concepção (PETERS, 1996).

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

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

(1994) concluíram que as alterações nucleares e citoplasmáticas promovidas no oócito, denominadas de modificações pré-maturacionais, são devidas à responsividade do folículo à pulsatilidade do LH antes do pico ovulatório, sendo estas modificações pré-requisitos para o oócito alcançar a competência.

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

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

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

No entanto, oócitos não sofrem apenas maturação nuclear, mas também maturação citoplasmática e molecular, nas quais mudanças como rearranjo de organelas (FAIR *et al*, 1997) e síntese de proteínas e mRNA (WU *et al*, 1996; SÁNCHEZ *et al*, 2012) são cruciais para a fertilização e posterior desenvolvimento embrionário.

Os oócitos adquirem a maturação nuclear e citoplasmática durante a foliculogênese. Em humanos, a capacidade de terminar a meiose coincide com a formação do antro, quando o oócito alcança cerca de 80% do seu tamanho final (DURINZI *et al*, 1995). O desenvolvimento da competência, no que diz respeito à maturidade citoplasmática, é adquirido depois que o oócito já

se tornou meioticamente competente. Assim, um oócito competente é aquele capaz de terminar a meiose, e assim ser fertilizado e gerar um embrião capaz de chegar a termo.

O enriquecimento dos meios de maturação *in vitro* (MIV) com soro inativado, embora contribua para o desenvolvimento, pois este é fonte de vários hormônios e fatores de crescimento, possui a desvantagem da impossibilidade de padronização de um protocolo, uma vez que a composição do soro é desconhecida, além da possibilidade de contaminação com elementos patogênicos. Portanto, o estudo detalhado dos fatores que realmente influenciam para que o processo de maturação fica prejudicado com a utilização de soro no meio de MIV (CHIAN *et al*, 2003). As alternativas a este aditivo são as macromoléculas sintéticas como, por exemplo, o PVA (Álcool Polivinílico), o qual foi utilizado neste estudo.

### 3.1.2. Maturação Nuclear

A oogênese em mamíferos é iniciada ainda na vida embrionária e só termina na idade reprodutiva. Esta se inicia com a formação das células germinativas primordiais, as quais migram para o epiblasto embrionário, na crista genital. Uma vez estabelecidas no ovário em desenvolvimento, estas células perdem sua mobilidade e são chamadas de oogônias. As oogônias sofrem várias mitoses antes de iniciarem a meiose (maturação nuclear), quando então são chamadas de oócitos (PINCTON, 1998; SÁNCHEZ *et al*, 2012). Os oócitos iniciam o processo de maturação oocitária, ainda na vida embrionária, mas este só irá ser concluído com a fertilização do gameta.

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

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

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

A habilidade de o oócito completar a meiose também é chamada de competência meiótica, a qual é adquirida gradualmente durante a foliculogênese. Os oócitos primeiro adquirem capacidade para sofrer a quebra da vesícula germinativa e condensação cromossômica, depois, mais adiante no desenvolvimento folicular, é requerida a capacidade para progredir até a metáfase I (MI) (TSAFRIRI e CHANNING, 1975), e finalmente ele adquire habilidade para alcançar o estágio de metáfase II (MII) e ser fertilizado (SÁNCHEZ *et al*, 2012).

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

Dekel & Beers (1978) identificaram o cAMP como bloqueador da meiose em oócitos de ratas. A hipótese é que o cAMP gerado pelas células somáticas do folículo ovariano seja transmitido para o oócito via junções *Gap*. A retomada da meiose induzida pelo pico de LH, portanto, envolve a quebra da comunicação oócito - células foliculares, fazendo com que haja diminuição da concentração intraoocitária de cAMP, resultando na saída do bloqueio meiótico (DEKEL *et al*, 1981; NOGUEIRA *et al*, 2003). Também tem sido sugerido que a expressão de fosfodiesterase exerce função no controle do nível de cAMP e, portanto, na maturação nuclear (TSAFRIRI *et al*, 1996).

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

(2005), diz ainda que a ação inibitória do cAMP não é gerada pelo oócito, mas transmitida pelas células foliculares via junções gap.

A retomada da meiose e sua progressão para MI dependem da ativação do MPF (fator promotor da maturação, do inglês- maturation promoting factor) pertencente à família das proteínas quinases. O MPF é um composto dimérico formado por uma subunidade catalítica, a p34cdc2, e uma subunidade reguladora, a ciclina B. Em sua forma inativa, pré-MPF, o complexo se apresenta fosforilado nos resíduos Thr14 e Tyr 15 da subunidade catalítica (GAUTIER *et al*, 1998). O MPF é ativado pela desfosforilação desses resíduos, cuja reação é catalisada pela enzima cdc 25 fosfatase (DAI *et al*, 2000). Estudos indicam que o cAMP inibe a ativação do MPF, por prevenir a sua desfosforilação, e também reprime a síntese de ciclina B, diminuindo a quantidade disponível de pré - MPF (JOSEFSBERG *et al*, 2003). O MPF ativo, irá fosforilar as proteínas do envoltório nuclear e aquelas envolvidas com a condensação da cromatina (histonas) e reorganização do citoesqueleto (VERDE *et al*, 1992).

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

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

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

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

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

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

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

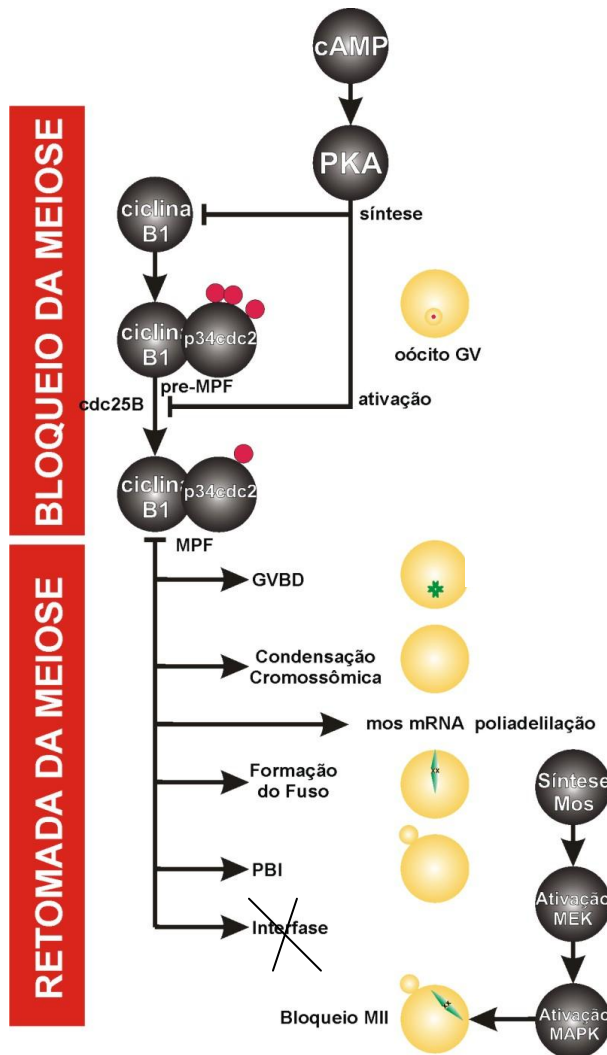
Oócitos de bovinos, não necessitam de MAPKs para que ocorra a quebra da vesícula germinativa, porém, quando estas enzimas não estão presentes a meiose é reiniciada e esta não é bloqueada novamente no estágio de MII, levando à conclusão de que estas enzimas têm um papel crítico no bloqueio da meiose através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

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

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

Os esquemas a seguir ilustram o que foi dito anteriormente.

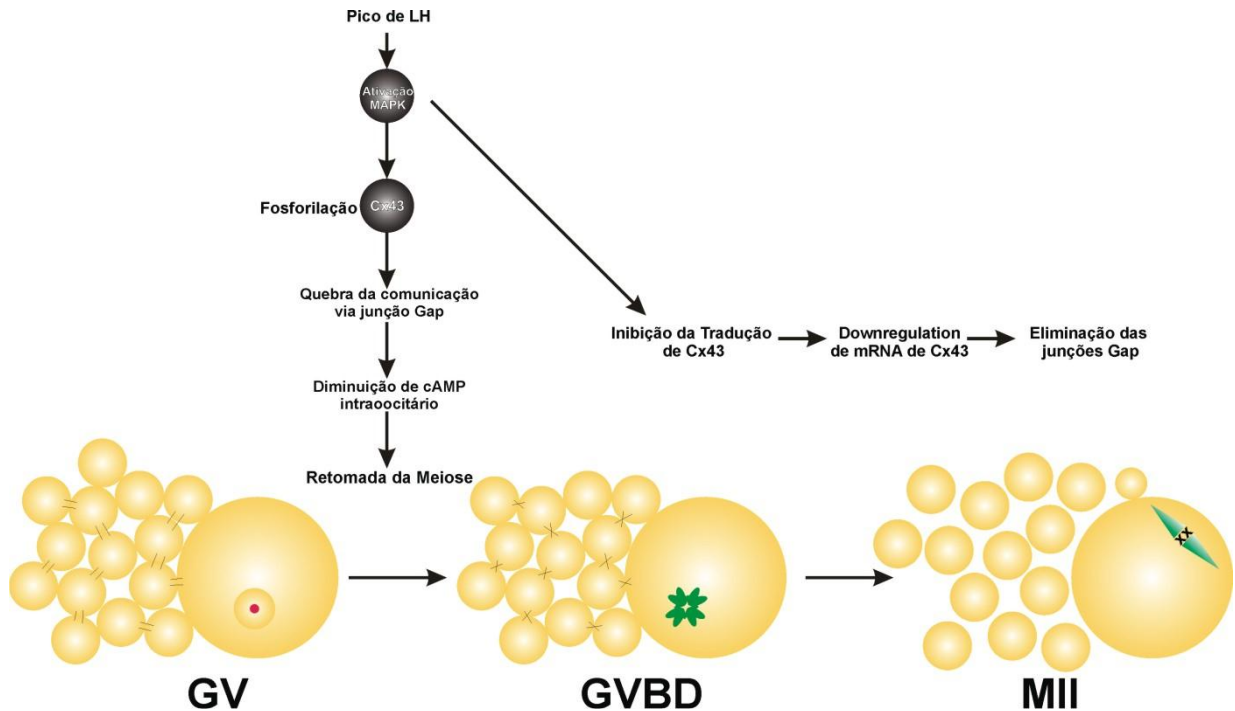




Esquema 1. Mecanismo de regulação da maturação nuclear.

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

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



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

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

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

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

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

Existem evidências crescentes que demonstram que a qualidade e competência do oócito dependem de eventos que ocorrem antes da retomada da meiose, sugerindo que o oócito acumula

informações apropriadas para se tornar competente antes que ocorra a condensação cromossômica. (SIRARD *et al*, 2007).

### 3.1.3. Maturação citoplasmática

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

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

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

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

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

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

As modificações ultraestruturais que ocorrem durante o processo de maturação são de extrema importância para o oócito assegurar sua competência para o desenvolvimento.

No folículo primordial, o oócito possui um núcleo central com cromatina descondensada e, geralmente, um ou dois nucléolos inativos. As mitocôndrias são dispostas centralmente e são arredondadas. O córtex oocitário é repleto de “coated pits” (vesículas recobertas por membrana), através das quais o oócito se comunica com as células da granulosa por endocitose (HYTTEL *et al*, 1997; KACINSKIS *et al*, 2005).

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

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

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

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

Após o pico de LH, há a quebra da vesícula germinativa, o oócito em MII apresenta os grânulos corticais alinhados com a membrana plasmática, as gotas de lipídeos e as mitocôndrias adquirem uma posição mais central no ooplasma, deixando uma zona periférica sem organelas,

na qual a principal característica é a presença de grumos de retículo endoplasmático liso. O espaço perivitelínico se desenvolve para evitar a poliespermia, e o complexo de Golgi praticamente desaparece (ASSEY *et al*, 1994; DIEZ *et al*, 2005; HYTTEL *et al*, 1997).

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

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

### 3.1.3.2. Maturação Molecular

Os processos de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial são caracterizados por etapas distintas tais como a ativação do oócito, primeira clivagem, ativação do genoma embrionário (transição materno-zigótica – TMZ), compactação ou formação do blastocisto. Mudanças tais que exigem uma expressão de genes de origem materna (oócito) e do próprio embrião (após a TMZ) muito bem orquestrada (KIDDER, 1992).

Os genes associados com o desenvolvimento da competência oocitária são conhecidos por estarem envolvidos na regulação da transcrição, tradução e modificações pós-traducionais de proteínas, regulação do ciclo celular, foliculogênese, estresse oxidativo, composição de histonas, sinalização via junções *gap*, metabolismo e sistemas de transporte (WRENZYCKI *et al*, 2005). O estudo das características moleculares de oócitos de alta e baixa competência para o desenvolvimento é crítico para o estabelecimento de um critério mais seguro de seleção de oócitos de alta capacidade de gerar embriões viáveis.

Portanto, para determinação da base molecular da maturação oocitária e do desenvolvimento inicial embrionário são utilizadas técnicas que avaliam a expressão diferencial de genes de interesse (WRENZYCKI *et al*, 2007).

### 3.1.3.2.1 Genes escolhidos para avaliação da base molecular da maturação de CCOs cultivados em meio complexo e definido.

O gene HSP-70 (Heat Shock Protein 70) é um modulador da resposta celular ao estresse térmico e o gene PRDX-1 (Peroxirredoxina 1) apresenta ação antioxidativa (LEYENS *et al.*, 2004; VIREQUE *et al.*, 2009). Ambos desempenham um papel de proteção celular, impedindo a apoptose (EDWARDS *et al.*, 2001; NEUMANN *et al.*, 2003).

As proteínas de choque térmico (HSPs) são pertencentes à família das chaperonas, as quais são responsáveis por auxiliar no processo de reparação de erros que podem ocorrer no processo de montagem da estrutura terciária de outras proteínas. Atuam também estabilizando proteínas danificadas, previnem a agregação, o que permite uma oportunidade para a reparação de danos no envelhecimento e também inibem a apoptose (WELCH, 1992; HARTL *et al.*, 2002; PAULA-LOPES *et al.*, 2002).

As HSPs estão intimamente associadas com respostas celulares ao estresse causado por condições ambientais e da cultura inadequados, incluindo calor, baixo pH e anoxia (CANDOLIA *et al.*, 1999).

Desde que a expressão de genes relacionados à resposta da célula ao estresse, tais como HSP-70.1 e PRDX-1 pode ser alterada durante o cultivo de oócitos e embriões, a expressão desses genes pode ser considerada como marcador das condições de cultura utilizada (NEUMANN *et al.*, 2003; WRENZYCKI *et al.*, 2005).

O sistema IGF (insulin-like growth factor) está envolvido no controle do desenvolvimento folicular em mamíferos, atuando na proliferação das células foliculares e esteroidogênese (LUCY, 2000). É sabido que o IGF afeta a competência e a maturação oocitária. Em equinos, a adição de IGF-I ao meio de maturação *in vitro* não alterou a taxa de maturação nuclear, mas exerceu um efeito positivo na maturação citoplasmática (CARNEIRO *et al.*, 2001). Além disso, exerce ação como fator anti-apoptótico durante a maturação de oócitos (WASIELAK e BOGACKI, 2007).

Pelo fato de o sistema MIV-C conter IGF-I em sua constituição, a quantificação da expressão do receptor IGF1R se torna interessante.

O fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9) pertence à superfamília TGF- $\beta$  e está envolvido na regulação da foliculogênese (SHIMIZU *et al.*, 2004). O GDF9 também inibe a apoptose de células da granulosa e a atresia folicular (ORISAKA *et al.*, 2006) e tem sido

relacionado à comunicação entre as células do *cumulus* e o oócito (GILCHRIST e THOMPSON, 2007).

Altos níveis da forma madura de GDF9 no fluido folicular de humanos foram significativamente correlacionados com oócitos maduros e qualidade embrionária, ou seja, à competência oocitária (GODE *et al*, 2011).

O GDF9, por ser um fator de fundamental importância para o crescimento folicular, incluindo a maturação oocitária, trata-se de um bom marcador de competência para o desenvolvimento.

### 3.2. Condições de cultivo

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

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

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

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

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

estradiol e aumento da secreção de progesterona (CAMPBELL, 1989; GONG *et al*, 1994; LANGHOUT *et al*, 1991) na cultura.

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

Modelos que não utilizam soro em sua constituição são então necessários porque, embora o soro possua vários fatores essenciais para o desenvolvimento celular, como hormônios, fatores de crescimento e de proliferação celular, é impossível controlar ou identificar os constituintes que afetam o processo de diferenciação celular (GUTIÉRREZ *et al*, 1997).

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

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

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

Ali e Sirard (2002) utilizaram PVP (polivinil pirrolidone) e PVA, macromoléculas sintéticas na maturação *in vitro* de oócitos bovinos em substituição ao soro e ao BSA, chegando à conclusão de que CCOs bovinos podem ser maturados *in vitro* na ausência de soro, ou BSA, sem nenhum efeito negativo no desenvolvimento embrionário. Acharam, ainda, que a suplementação do meio de maturação com PVP-40 promove maior desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, do que quando o meio de cultivo é suplementado com soro ou BSA (34,6%, 20,6% e 17,4% respectivamente).

A substituição do soro por álcool polivinílico (PVA) tem se mostrado adequada para a maturação *in vitro* (ABEYDEERA *et al*, 1998). Álcool polivinílico é um polímero sintético, com um peso molecular de 30.000-70.000. É usado nos meios de cultura para estabilização da pressão osmótica e como surfactante e quelante de metais pesados (HIRAO *et al*, 2004). Há evidências de que o PVA pode substituir as proteínas (ALI *et al*, 2002) na MIV de oócitos bovinos sem prejudicar seu posterior desenvolvimento (DOWNS *et al*, 1991;



LONERGAN *et al*, 1992; MONAGHAN *et al*, 1993; KESKINTEPE *et al*, 1996; WATSON *et al*, 2000; MIZUSHIMA *et al*, 2001).

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

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

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

O estabelecimento de sistemas de cultura que podem mimetizar as condições de maturação de oócitos *in vivo* pode prevenir ou minimizar a interferência das condições de cultura sobre os oócitos, uma vez que sabemos que as condições de cultura e fatores intrínsecos do oócito são determinantes para a competência oocitária (SIRARD *et al*, 2007).

### **3.3. Mecanismos de inibição da retomada da meiose**

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

Para tentar resolver este problema, várias modificações nas condições de maturação utilizadas atualmente têm sido propostas, tais como o estabelecimento de dois passos de cultivo incluindo uma pré-maturação na presença de um inibidor sintético de maturação nuclear, ou co-

cultivo com células, ou tecidos foliculares (FRANZ *et al*, 2002; LE BEAUX *et al*, 2003; MACHALKOVA *et al*, 2004; SIRARD *et al*, 1993; 1992).

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

#### *Inibidores de transcrição*

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

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

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

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

A inibição da GVBD mediada pelo DRB é claramente mais efetiva na presença de suplementação com gonadotrofinas (LH/FSH), talvez pelo fato de que as gonadotrofinas inibam um pouco a atividade transcricional, tornando o oócito mais sensível ao DRB. Foi observado também que a inibição da atividade transcricional é acompanhada por inibição da expansão das células do *cumulus*, e que a habilidade do DRB manter os oócitos em GV é completamente dependente da presença destas células (FARIN e YANG, 1994).

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

#### *Inibidores de síntese proteica*

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

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

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

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

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

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

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

#### *Inibidores de atividade quinase*

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

Estudos com derivados de purinas, especificamente direcionados para inibição da atividade do MPF, têm sido determinados e utilizados de forma bem sucedida para prevenir a

meiose em pequenos organismos. Dentre estes inibidores, a roscovitina e o butirolactona, possuem o mesmo mecanismo de ação, que é a competição por sítios de ligação de ATP, impedindo a ligação do ATP necessária para as atividades de fosforilação, o que impede a ativação do MPF (MEIJER, 1996).

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

Altas doses de roscovitina também são capazes de inibir a atividade de MAPKs, como a erk 1 e erk 2 (MEIJER *et al*, 1996). Este fato pode explicar porque uma pequena dose de roscovitina, 12,5  $\mu\text{M}$ , permite a quebra da vesícula germinativa, mas os oócitos que retomam a meiose não ultrapassam o estágio de MI (MERMILLOD *et al*, 2000).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### *Inibidores fisiológicos*

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

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

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

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

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

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

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

Tais eventos ocorrem pela perda da comunicação oócito-células da granulosa, realizada via junções *Gap* (LANUZA *et al*, 1998; TSAFRIRI e POMERANTZ, 1984). Cada junção *gap* é

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

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

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



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

Quando CCOs são cultivados na presença de monocamada de células da teca e células da granulosa oriundas de folículos grandes ao mesmo tempo, a presença das CG na cultura é capaz de anular o efeito inibitório das CT, no entanto, quando este co-cultivo é feito na presença de um ativador da proteína quinase A (PKA), o efeito inibitório das células da teca não é anulado pelas células da granulosa, levando a uma taxa de 53,4% de GV, mostrando que a ativação da PKA nas CG leva ao bloqueio meiótico por não reverter a inibição causada pelas CT. Giometti *et al* (2005), observaram que a presença de angiotensina II ( $10^{-11}$  M) foi responsável por anular o efeito inibitório das células da teca quando estas foram cultivadas com oócitos bovinos, no entanto, quando o cultivo ocorre na ausência de células foliculares, a angiotensina II não exerce nenhuma influência.

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

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

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

### **3.4. Justificativa**

Uma das principais causas do baixo desempenho de oócitos maturados *in vitro* é o fato de estes serem retirados de folículos imaturos, e por isto, ainda não ter passado pelo processo de aquisição de competência que ocorre no final do desenvolvimento folicular, logo após o pico de LH (BREVINI *et al*, 2007; SIRARD *et al*, 2006). Portanto, torna-se necessário o melhoramento

da técnica de maturação *in vitro* (MIV) para permitir ao oócito se desenvolver *in vitro* de forma mimética à situação *in vivo*.

Por esta razão, tem sido pesquisados sistemas de cultura que retardam a maturação nuclear. Com isso, será obtido um tempo adicional para que as modificações citoplasmáticas e moleculares aconteçam e assim seja alcançada uma maior sincronia do processo maturacional oocitário como um todo e a competência seja atingida.

Estudos propõem que duas etapas sejam realizadas antes da fertilização *in vitro*, uma etapa de pré-maturação, onde o oócito tem a meiose bloqueada, seguida da etapa que é a maturação *in vitro* propriamente dita, onde ocorre a reversão do bloqueio meiótico (FRANZ *et al*, 2002; LE BEAUX *et al*, 2003; MACHALKOVA *et al*, 2004).

Um sistema de cultura completamente definido desenvolvido por nosso grupo (MIV- C), foi capaz de promover a inibição da retomada da meiose na ausência de drogas que bloqueiam estruturas celulares, mas na presença de hormônios e substratos metabólicos (OLIVEIRA E SILVA *et al*, 2011 - anexo A).

Com este sistema, foi obtida uma alta taxa de bloqueio, mais de 70% de inibição da meiose por um período de 24 horas sem causar danos ao aparato celular oocitário que impedisse os oócitos cultivados de retomarem a divisão celular quando colocados em meio de maturação controle, ou seja, conseguimos uma alta taxa de inibição da meiose, porém totalmente reversível.

Considera-se, portanto, o sistema MIV-C como um bom modelo para o estudo dos eventos que ocorrem durante a pré-maturação do oócito sem a necessidade do uso de inibidores de meiose, já que fornece um tempo adicional para o estudo da sincronia entre maturação citoplasmática e nuclear (OLIVEIRA E SILVA *et al*, 2011 – anexo B).

A pré-maturação em meio definido (MIV-C) ainda propiciou aos CCOs cultivados um ambiente hormonal semelhante ao observado *in vivo*, pois as células do *cumulus* dos CCOs mantiveram-se viáveis e com potencial esteroidogênico semelhante ao de um folículo dominante, ou seja, com alta produção de estradiol durante todo o cultivo (OLIVEIRA E SILVA, 2008).

Com o desenvolvimento de um sistema de pré-maturação totalmente definido, o pequeno entendimento que temos a respeito da limitada aquisição de competência pelos oócitos durante a maturação *in vitro*, poderá ser esclarecido (Mc KIERNAN e BAVISTER, 1992).

Ocorre que os testes realizados até então com esse sistema de cultura foram feitos com CCOs cultivados por 24 horas em meio definido (MIV-C), seguidas de mais 24 horas de cultivo em meio de maturação controle, ou seja, não é sabido ainda se o cultivo adicional de 24 horas no próprio meio definido é capaz de reverter a inibição da maturação nuclear promovida

previamente, nem qual é o comportamento das organelas (maturação citoplasmática), ou a constituição molecular dos CCOs nesse cultivo adicional.

Os estudos foram portanto estendidos de maneira a analisar a maturação nuclear, citoplasmática e molecular de CCOs cultivados por 24 e 48 horas no sistema MIV-C e em uma variação deste, MIV-B, que se trata de uma formulação mais simples de MIV-C, sem hormônios e fatores de crescimento.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

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

Foram utilizados ovários de vacas abatidas nos abatedouros Friboi ®, localizados em Formosa - GO, e Planaltina – DF, situados a aproximadamente uma hora e meia e uma hora, respectivamente, do Laboratório para Estudo da Reprodução –UnB, onde foram processados. Imediatamente após o abate, os ovários foram imersos em solução fisiológica a 30-35° C, acrescida de antibiótico (SIRARD e BILODEAU, 1990). Ao chegar ao laboratório, estes foram lavados em solução fisiológica pré-aquecida, acrescida de antibiótico e mantidos nesta mesma solução em banho-maria a 35°C durante o processo de aspiração folicular.

### **4.2. Recuperação dos oócitos**

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

em placas Nunc de quatro poços, em estufa com 95% de umidade, 5% de CO<sub>2</sub>, a 38,5° C, 48 horas.

Foram cultivados de 20-25 CCOs, por grupo experimental, por 24, 32, 40 ou 48 horas em 400 µL de meio definido (MIV-C ou MIV-B) ou por 24 horas em 400 µL de meio de maturação controle (TCM-199+SFB). O meio de cultura não foi substituído ou repostado durante todo o tempo de cultivo, e em todos os grupos.

### **4.3. Composição dos meios de maturação *in vitro***

Três meios de MIV foram utilizados: um meio de maturação (controle) e dois meios definidos.

O meio controle constituiu-se de TCM-199 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 49,9 µg/mL piruvato, 20µg/mL FSH e 50 IU/mL penicilina e estreptomicina.

A composição dos meios definidos (MIV-B e MIV-C) está relatada em uma patente depositada pela Universidade de Brasília (ROSA e SILVA *et al*, 2008). O MIV-C é composto de meio alpha-MEM suplementado com PVA, 100ng/mL insulina bovina, 10ng/mL IGF-I, androstenediona, aminoácidos não essenciais, 5µg/mL transferrina, 1,4ng/mL selênio, bicarbonato, hepes e antibióticos. Já o MIV-B possui a mesma composição do MIV-C, porém não possui adição dos hormônios insulina, IGF-I e androstenediona.

### **4.4. Avaliação da maturação nuclear**

Após o cultivo, os CCOs, foram retirados dos respectivos tratamentos, desnudados mecanicamente e fixados em solução de etanol:ácido acético (3:1) por 48h para então serem transferidos para lâminas de vidro, corados com lacmóide 1% e avaliados quanto ao estágio da meiose em microscópio óptico de contraste de fase, nos aumentos de 40 e 100X (SIRARD & COENEN,1993).

Os CCOs foram classificados em: Imaturos (CCOs em vesícula germinativa, quebra da vesícula germinativa e condensação cromossômica); Intermediários (CCOs em metáfase I, anáfase I e telófase I) ou Maduros (CCOs em metáfase II) (Fig.1).

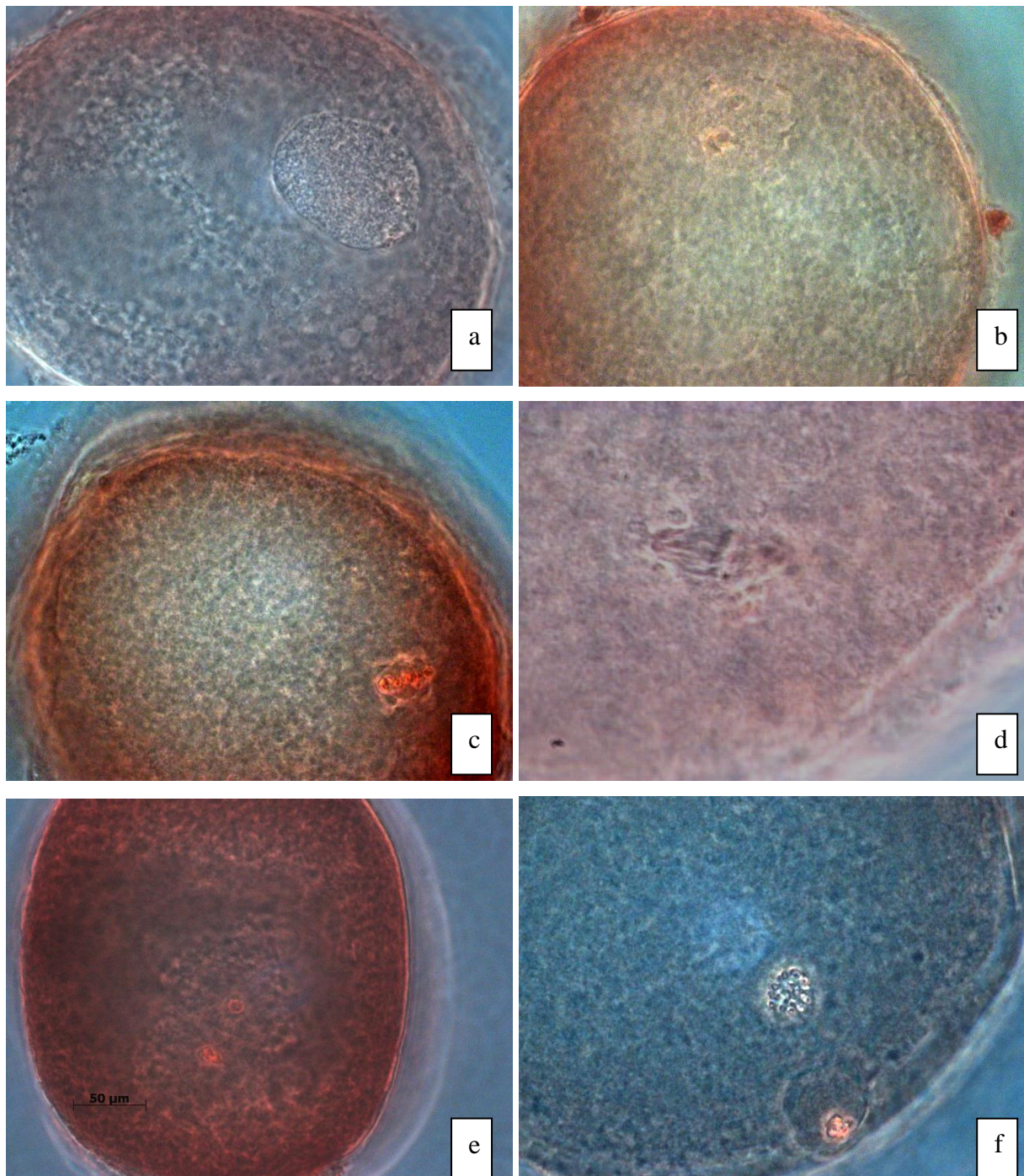


Fig.1. Configurações cromossômicas da meiose. a; oócito em vesícula germinativa. b; oócito em quebra da vesícula germinativa. c; oócito em metáfase I. d; oócito em anáfase I. e; oócito em telófase I. f; oócito em metáfase II.

#### 4.5. Avaliação da maturação citoplasmática por microscopia eletrônica de transmissão

Os CCOs de cada grupo e do tempo zero foram processados para análise ao microscópio eletrônico de transmissão (n=42). Os CCOs foram fixados em solução contendo glutaraldeído

2%, paraformaldeído 2%, sacarose 3% e CaCl<sub>2</sub> 5mM em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH7,2 à temperatura ambiente por 1h e pós-fixados por mais 1h em tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e CaCl<sub>2</sub> 5mM em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH7,2. Em seguida os CCOs foram contrastados por 2h com acetato de uranila 0,5%, desidratados em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) e emblocados em resina epoxy Spurr. Secções semifinas foram coradas com azul de toluidina e examinadas ao microscópio óptico. Secções ultrafinas (70nm) foram contrastadas com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo 1%. Observações ultraestruturais foram realizadas com o microscópio JEOL-JEM 1011. As imagens foram obtidas com a câmera GATAN BioScan, modelo 792.

A maturação citoplasmática foi avaliada de acordo com Hyttel *et al*, (1997) que considerou como características de imaturidade: pequeno espaço perivitelínico (PvS), microvilosidades deitadas, mitocôndrias presentes na região cortical do oócito e a presença de grumos de grânulos corticais. As características de maturidade consideradas foram: PvS bem desenvolvido, microvilosidade eretas, mitocôndrias dispersas pelo citoplasma e grânulos corticais alinhados. As seguintes características de transição: microvilosidades deitadas/eretas, mitocôndrias iniciando a dispersão e grânulos corticais se alinhando foram consideradas como em processo de maturação ou maduras, já que também foram observadas no nosso grupo controle (maduro).

#### **4.6. Avaliação da expressão gênica em CCOs cultivados em MIV-C OU MIV-B**

##### *4.6.1. Extração do RNA total e transcrição reversa*

O RNA total foi extraído de três pools de 10 oócitos por tratamento, previamente desnudados mecanicamente e congelados em eppendorff em freezer à temperatura de -80°C até a extração. A extração seguiu as recomendações do fabricante do kit RNeasy Micro Kit® (Qiagen, Hilden, Alemanha). A lise das células foi feita com tampão RLT acrescido de 10% de β-Mercaptoetanol (β-ME; Gibco Brl Life Technologies, Nova York, EUA). O lisado foi homogeneizado, acrescido de etanol a 70% e transferido para uma coluna de obtenção do RNA. Para lavagem foi adicionado tampão RW1, e posteriormente foi realizada a incubação com solução de DNase por 15 minutos. Após este período ocorreu novamente a lavagem com o tampão RW1 e com o tampão RPE. Em seguida, foi feita a adição de etanol a 80% na coluna e centrifugação para secar a membrana onde estava contido o RNA. Para eluição, foram utilizados 12 µL de água RNase-free, gerando um volume final de aproximadamente 11 µL (~55 ng).

A transcrição reversa foi obtida com o kit comercial *SuperScript III First-Strand*

*Synthesis Supermix*® (Invitrogen, Califórnia, EUA). Brevemente, 6 µL (~30ng) de RNA foram utilizados em cada reação de síntese de cDNA. Uma reação contendo RNA, *primer* oligo dT, tampão de pareamento e água livre de RNase/DNase foi incubada por 5 minutos a 65°C. Em seguida, 12 µL de um *mix* (2X *First-Strand reaction mix* e *SuperScript III RNaseOUT Enzyme mix*) foi adicionado à reação e esta foi incubada a 50°C por 50 minutos, seguido de 85°C por 5 minutos. O volume final foi de 20 µL (~14.000 ng) de cDNA por reação. Após a extração e transcrição reversa, 1 µL do RNA e cDNA de cada amostra foram avaliados em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000, Wilmington, EUA), para análise da concentração e pureza do material. O cDNA de cada grupo experimental permaneceu estocado em freezer a -80°C até posterior utilização.

#### 4.6.2. PCR em tempo real

Para maior eficiência nas reações de PCR em tempo real, as quantidades dos primers (IGF1R, GDF9, PRDX1, HSP70.1, GAPDH e β-Actina) e de cDNA foram previamente padronizadas. Após padronização, foram feitas reações com o kit comercial *Power SYBR*® *Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA). A reação contendo cDNA, par de *primers*, *Master Mix* (dNTPs, referência passiva-ROX, *SYBER Green*) e 0,1 U de Taq DNA Polimerase, em um volume final de 25 µL, foi incubada a 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos, temperatura de pareamento específica para cada *primer* (Tabela 1) por 30 segundos e extensão a 60°C por 30 segundos. Controles negativos foram preparados em que o cDNA foi omitido durante a reação. Foram feitas reações em triplicata para cada amostra (de todos os grupos) das respectivas repetições em placas ópticas de reação de 96 poços (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA).

A quantificação relativa foi realizada utilizando-se o método do CT comparativo, com os resultados expressos em relação a genes de referência endógena e um grupo calibrador (grupo controle). Os genes de referência endógena foram GAPDH e β-Actina, pois estes genes são utilizados em vários trabalhos de expressão gênica em oócitos bovinos (Mourot *et al*, 2006; Sagirkaya *et al*, 2007) e têm fornecido bons resultados por apresentar pouca variação nos níveis de mRNA durante a MIV (Bettegowda *et al*, 2006). Como grupos calibradores foram utilizados oócitos do tempo zero (imaturos) e o sistema de maturação controle (Tratamento T24).



Tabela1. Sequência dos *primers* específicos, temperaturas de pareamento, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no GeneBank

Produto	Sequência do <i>primer</i>	Temp. pareamento	Tamanho do produto	Nº de acesso GeneBank/Ref
IGF1R	F 5' -CGCTGGATGTCCCCTGAGT - 3' R 5' -GTTGTCCGGCTTGTCCAGAA- 3'	53°C	180pb	(Bertolini <i>et al.</i> , 2002)
GDF9	F 5'GACCCCTAAATCCAACAGAA3' R 5'AGCAGATCCACTGATGGAA3	53°C	120pb	NM_174681
PRDX1	F 5'ATGCCAGATGGTCAGTTCAAG3' R 5'CCTTGTTTCTTGGGTGTGTTG3	53°C	224pb	(Mourot <i>et al.</i> , 2006)
HSP70.1	F 5'AACAAGATCACCATCACCAACG3' R 5'TCCTTCTCCGCCAAGGTGTTG3'	59°C	275pb	NM 174550
$\beta$ -Actina	F 5'GACATCCGCAAGGACCTCTA3' R 5'ACATCTGCTGGAAGGTGGAC3'	53°C	205pb	NM_173979
GAPDH	F 5'CCAACGTGTCTGTTGTGGATCTGA3' R 5'GAGCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG3'	53°C	237pb	(Mourot <i>et al.</i> , 2006)

#### 4.7. Delineamento experimental

Como a inibição da maturação nuclear foi observada em CCOs cultivados por 24h em MIV-C, um período adicional de cultivo (24h) nesse mesmo meio foi realizado para avaliar a capacidade de reversão do bloqueio meiótico. Além disso, a cinética da maturação foi analisada em outro meio desenvolvido pelo laboratório, o MIV-B. Para isso foi realizada uma avaliação tempo-dependente da maturação nuclear oocitária onde os CCOs foram cultivados em meio definido (MIV-B ou MIV-C) por 24, 32, 40 e 48h.

Os tratamentos foram nomeados da seguinte maneira:

- T24: CCOs cultivados por 24 horas em meio de maturação controle;
- B24, B32, B40 e B48: CCOs cultivados por 24, 32, 40 e 48 horas respectivamente, em MIV-B;
- C24, C32, C40 e C48: CCOs cultivados por 24, 32, 40 e 48 horas respectivamente, em MIV-C.

Para análise da maturação citoplasmática, tanto por microscopia eletrônica, quanto por expressão gênica, o grupo 0h, constituído por CCOs recém-aspirados dos folículos, ou seja, sem passar por nenhum tratamento, foi considerado o controle imaturo.

Experimento 1: Avaliação tempo-dependente da maturação nuclear:

Os CCOs (n= 774) recuperados e selecionados como descrito anteriormente foram cultivados nos tratamentos citados anteriormente e após o tempo de cultivo foram analisados quanto à maturação nuclear. Para avaliar o efeito dos diferentes tratamentos e tempos de cultivo na cinética da maturação nuclear, quatro replicatas de cada grupo experimental foram realizadas.

Experimento 2: Avaliação tempo-dependente da maturação citoplasmática por microscopia eletrônica de transmissão (MET):

Para esta análise, apenas os tempos de cultivo de 24 e 48h foram utilizados, além do grupo 0h (controle imaturo). Quantidades diferentes de CCOs foram utilizadas devido a dificuldades no processamento. Amostras com fixação ou contrastação inadequadas que resultaram na impossibilidade da análise foram descartadas.

Grupos					
Imaturo/0h	T24	B24	C24	B48	C48
4 CCOs	9 CCOs	10 CCOs	6 CCOs	9 CCOs	4 CCOs

Experimento 3a: Avaliação da expressão gênica de oócitos cultivados por 24 ou 48h em MIV-C:

Os grupos experimentais foram: cada alíquota = 10 oócitos

- Imaturo: oócitos do tempo 0h (controle imaturo);
- T24 CP: oócitos com corpúsculo polar (CP) cultivados por 24h em meio de maturação controle (controle maduro);
- C24-CP: oócitos com CP cultivados por 24h em MIV-C;
- C24-SCP: oócitos sem CP cultivados por 24h em MIV-C;
- C48-CP: oócitos com CP cultivados por 48h em MIV-C;
- C48-SCP: oócitos sem CP cultivados por 48h em MIV-C.

Experimento 3b: Avaliação da expressão gênica de oócitos cultivados por 24h em MIV-B:

Os grupos experimentais foram: cada alíquota = 10 oócitos

- Imaturo: oócitos do tempo 0h (controle imaturo);
- T24 CP: oócitos com corpúsculo polar (CP) cultivados por 24h em meio de maturação controle (controle maduro);
- B24-CP: oócitos com CP cultivados por 24h em MIV-B;
- B24-SCP: oócitos sem CP cultivados por 24h em MIV-B.

#### 4.8. Análise estatística

Os resultados da análise da maturação nuclear, bem como da análise da maturação citoplasmática por microscopia eletrônica de transmissão foram expressos em porcentagem. As diferenças foram comparadas pelo teste do qui-quadrado e consideradas significativas quando os valores de probabilidade eram iguais ou menores que 0,05 ( $P \leq 0,05$ ).

Para a análise da quantificação relativa dos genes foi utilizado o programa *Relative Expression Software Tool* (REST®) que possui o modelo estatístico *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation TEST*® (versão 384 - Beta, 2005) (PFAFFL, 2001) o qual foi utilizado para analisar os dados obtidos da quantificação relativa da PCR em tempo real. Esse modelo foi desenvolvido com base em testes de permutação, que são uma alternativa a ser utilizada quando testes paramétricos não podem ser usados. Esses testes obtêm resultados a partir de permutações aleatórias dos dados do experimento. Para análise da quantificação relativa utilizou-se como referência endógena o gene da  $\beta$ -Actina, cujo coeficiente de variação entre as amostras foi menor quando comparado com o GAPDH.

## 5. RESULTADOS

Após 24h de cultivo em meio de maturação controle (T24) cerca de 80% dos CCOs completaram a maturação nuclear, enquanto que aproximadamente 70% dos CCOs cultivados em meios de cultura definidos (MIV-B e MIV-C) permaneceram imaturos (Figs. 2 e 3). Com o objetivo de verificar a reversibilidade desta inibição da maturação nuclear, uma avaliação tempo-dependente foi realizada, onde os CCOs foram cultivados por mais 24h em MIV-B (B32, B40 e B48) ou MIV-C (C32, C40 e C48).

Durante as 24h adicionais de cultivo em MIV-C (C32, C40 e C48) o bloqueio meiótico foi mantido, e somente 30% dos CCOs apresentaram-se maduros (Fig. 2B).

A taxa de CCOs maduros, em metáfase II, cultivados em MIV-B por 48h (B48) foi o dobro da observada após as primeiras 24h de cultivo (Fig. 2A). O grupo B32 apresentou a maior taxa de oócitos em metáfase II das 48h de cultivo neste meio, aproximadamente 50%, sendo significativamente diferente do grupo C32 (Fig. 3B). A taxa de CCOs imaturos encontrada em B32, B40 e B48 variou entre 50 e 60% (Fig 2A).

Na comparação do estágio da meiose encontrado quando os oócitos foram cultivados em MIV-B ou MIV-C, não foram observadas diferenças significativas nos tempos de 24, 40 e 48h (Fig.3).

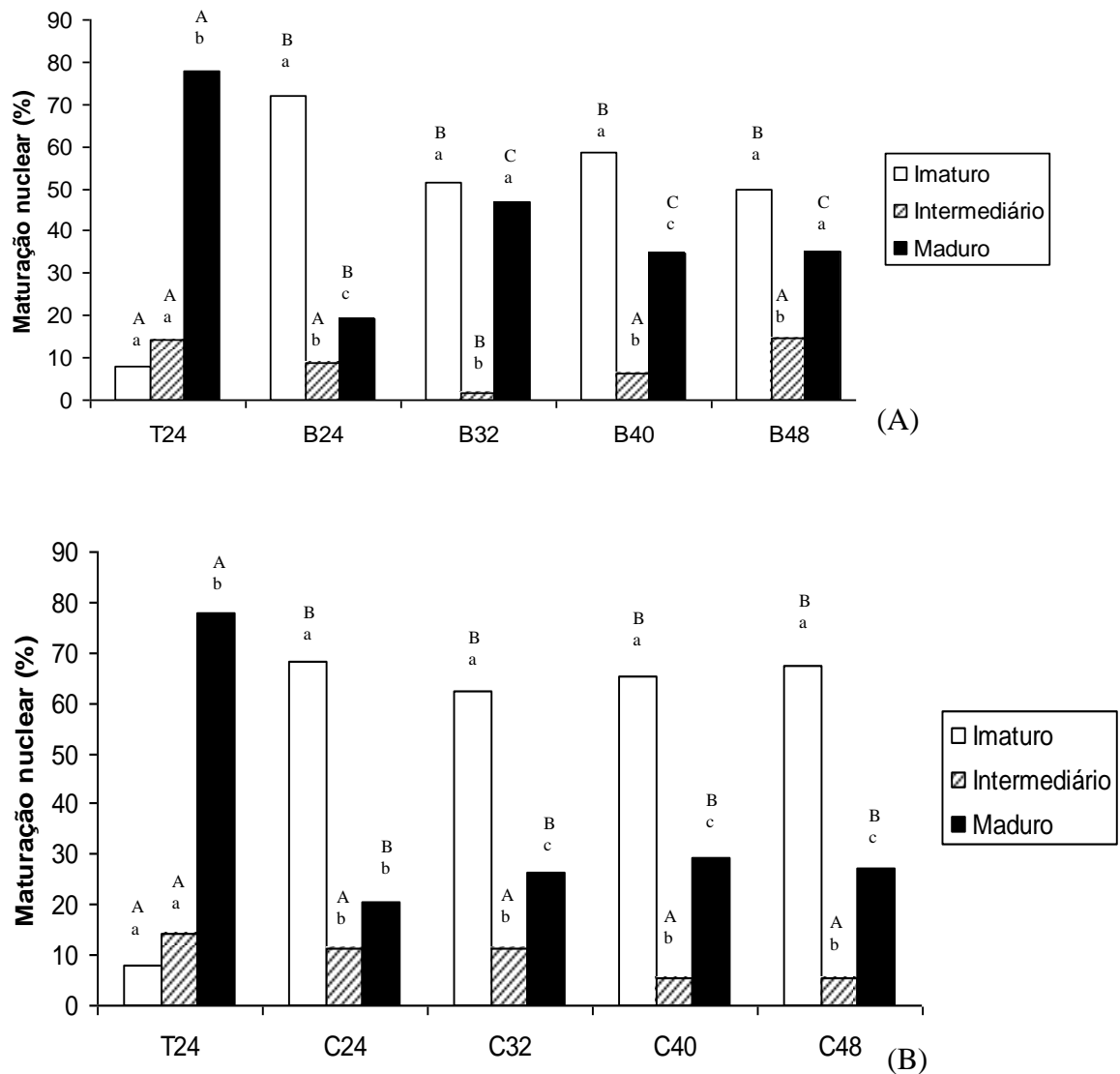


Fig. 2. A) Estágio da maturação nuclear de CCOs bovinos (n=536) cultivados em meio de maturação controle por 24h, ou em MIV-B por 24, 32, 40 e 48h. Porcentagem de oócitos imaturos, intermediários e maduros. B) Estágio da maturação nuclear de CCOs bovinos (n=525) cultivados em meio de maturação controle por 24h, ou em MIV-C por 24, 32, 40 e 48h. Porcentagem de oócitos imaturos, intermediários e maduros.

Letras minúsculas: diferença entre estágio da meiose dentro do mesmo grupo ( $p < 0,001$ ). Letras maiúsculas: diferença entre grupos dentro do mesmo estágio de maturação ( $p < 0,05$ ).

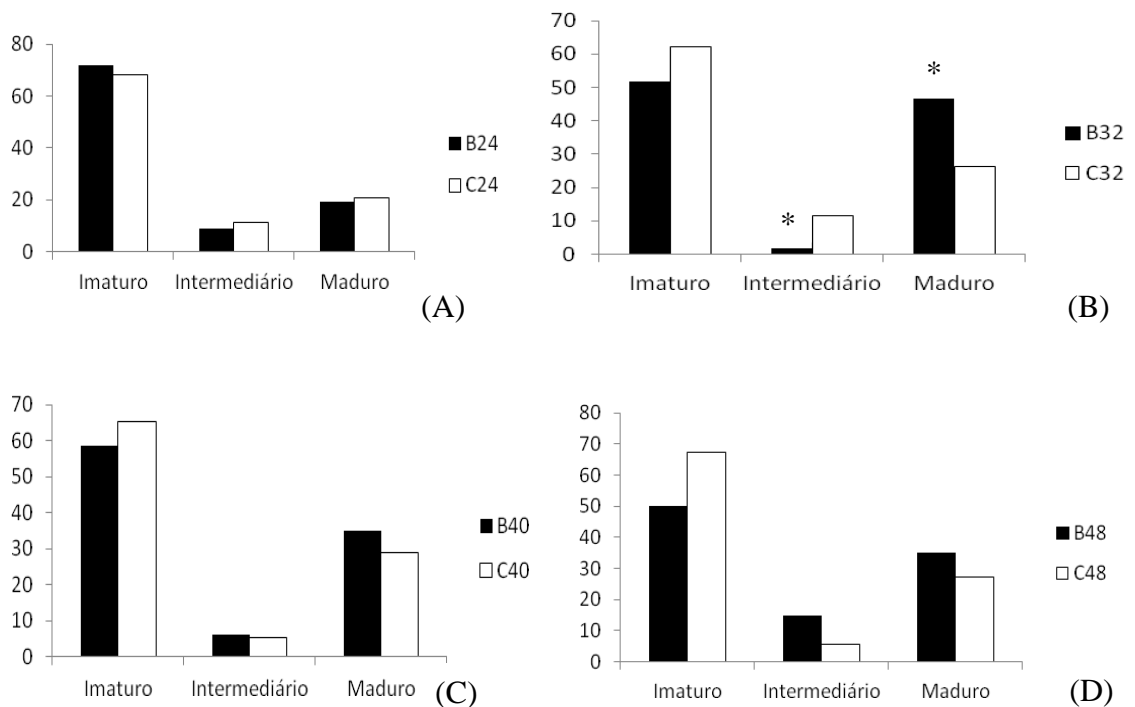


Fig. 3. A-D: Estágio da maturação nuclear de CCOs bovinos (n=483) cultivados por 24h (A), 32 (B), 40 (C) e 48h (D) em MIV-B ou MIV-C. No eixo Y, os dados estão expressos em porcentagem de oócitos imaturos, intermediários e maduros.

\* diferenças entre grupos dentro do mesmo estágio de maturação (p<0.05).

As características citoplasmáticas foram expressas em porcentagem de CCOs analisados (Tabela 2). Complexos *cumulus* oócitos imaturos (0h) apresentaram características de imaturidade de acordo com Hyttel *et al* (1997). Estas foram: mitocôndrias na região do córtex do oócito (Figs. 4a, 4e), grânulos corticais (GC) em grumos no citoplasma (Fig. 4c), a presença de microvilosidades (Mv) deitadas entre a zona pelúcida e a membrana plasmática (Fig. 4b) e as células do *cumulus* (CC) compactas (Fig. 4d).

Depois de 24h de cultivo em meio de maturação controle (T24), a maior parte dos CCOs alcançou o estágio de MII da meiose e o citoplasma destes também apresentou características de maturação. Estas foram espaço perivitelínico (PvS) bem desenvolvido e mitocôndrias dispersas pelo citoplasma (Fig. 4f), bem como GC alinhados à membrana plasmática e Mv eretas (Fig. 4g). A expansão das CC também foi observada nesse grupo e caracteriza um oócito maduro (Fig. 4f).

No decorrer das 48h de cultivo em MIV-B (B24 e B48), os CCOs apresentaram CC sem expansão (compactas) (Fig. 6a) e pequeno PvS (Figs. 5a, 5b, 6d), sendo semelhante ao grupo 0h (Tabela 2). Microvilosidades eretas (Figs. 5a, 6d) e mitocôndrias dispersas (Figs. 5d, 6c) pelo citoplasma foram observadas em pelo menos 45% dos CCOs analisados em todo o período (48h), sendo que essa última característica se apresentou semelhante ao controle maduro no grupo

cultivado por 24h (B24). Com relação aos GC, menos de 20% dos CCOs analisados apresentou grumos durante as 48h de cultivo (Fig. 5b), sendo que mais de 80% destes apresentou GC alinhados ou se alinhando (Fig. 6d), o que torna esse ponto semelhante ao controle maduro. Notam-se então características tanto de imaturidade quanto de maturação ou em processo de maturação citoplasmática (Tabela 2).

No cultivo com MIV-C, depois de 24h (C24), os CCOs exibiram como características de imaturidade: ausência de expansão das CC (Fig. 6b), pequeno PvS (Fig. 7d) e GC em grumos em 50% dos CCOs analisados (Fig. 7e). A característica de maturação observada semelhante ao controle maduro (T24) foi a presença de microvilosidades eretas em mais de 80% dos CCOs (Fig. 7c). As mitocôndrias ligeiramente dispersas pelo citoplasma (Figs. 7a, 7b, 7c), e presença de GC alinhados em 50% dos CCOs analisados (Fig. 7d) foram consideradas como características de maturação intermediárias, ou de oócitos em processo de maturação (Tabela 2).

Ao término das 48h de cultivo (C48), as CC continuaram compactas em todos os CCOs analisados, o pequeno PvS (Fig. 8a) foi observado em metade dos CCOs e as Mv deitadas foram vistas somente em 1 CCO (Fig. 8c). As características de maturação ou em processo de maturação consideradas foram PvS desenvolvido (Figs. 8b, 8d), mitocôndrias ligeiramente dispersas (Fig. 8a) ou dispersas pelo citoplasma (Fig. 8b), GC se alinhando (Fig. 8c) e microvilosidades eretas (Figs. 8d) em 50% dos CCOs analisados (Tabela 2).

Na comparação com os controles: imaturo (0h) e maduro (T24), observa-se que os CCOs cultivados nos meios definidos (MIV-B e MIV-C) estão em uma fase de transição, ou seja, os CCOs estão em processo de maturação. Ressalta-se, no entanto o fato de que MIV-B apresentou após 24h de cultivo o padrão de dispersão das mitocôndrias e dos grânulos corticais semelhantes ao controle maduro, e MIV-C apresentou as microvilosidades eretas em taxa semelhante ao controle T24.

Quando se compara MIV-B com MIV-C, nota-se que com relação ao PvS, tanto com 24 quanto com 48h de incubação, CCOs cultivados em MIV-B apresentam maior porcentagem de PvS pequeno em relação aos CCOs cultivados em MIV-C (Tabela 2). O mesmo acontece quando as microvilosidades são analisadas. Entretanto, quando o comportamento das mitocôndrias é analisado, o cultivo de 24h em MIV-B proporciona uma maior dispersão dessas organelas do que o cultivo pelo mesmo período em MIV-C. Com 48h de cultivo não há diferença entre os tratamentos nesse quesito.

A análise dos grânulos corticais mostra um adiantamento do processo de maturação dos CCOs cultivados por 24h em MIV-B em comparação com os CCOs cultivados por 24h em MIV-C (Tabela 2). No entanto, com 48h de cultivo tudo se iguala novamente.

Tanto MIV-B quanto MIV-C não promovem a expansão das CC quando os CCOs são cultivados por até 48h (Tabela 2).

Tabela 2. Características ultra-estruturais de CCOs bovinos imaturos e CCOs cultivados por 24h em meio de maturação controle (T24) ou por 24 ou 48h em MIV-B ou MIV-C.

		Imaturo/0h (n=4)	T24 (n=9)	C24 (n=6)	C48 (n=4)	B24 (n=10)	B48 (n=9)
CC	Compactas	100 (4) <sup>aA</sup>	0 <sup>aB</sup>	100 (6) <sup>aA</sup>	100 (4) <sup>aA</sup>	100 (10) <sup>aA</sup>	100 (9) <sup>aA</sup>
	Expandidas	0 <sup>bA</sup>	100 (9) <sup>bB</sup>	0 <sup>bA</sup>	0 <sup>bA</sup>	0 <sup>bA</sup>	0 <sup>bA</sup>
PvS	Pequeno	100 (4) <sup>aA</sup>	22.23 (2) <sup>aB</sup>	66.67 (4) <sup>aC</sup>	50 (2) <sup>aC</sup>	100 (10) <sup>aA</sup>	100 (9) <sup>aA</sup>
	Desenvolvido	0 <sup>bA</sup>	77.77 (7) <sup>bB</sup>	33.33 (2) <sup>bC</sup>	50 (2) <sup>aD</sup>	0 <sup>bA</sup>	0 <sup>bA</sup>
Mv	Deitadas	100 (4) <sup>aA</sup>	0 <sup>aB</sup>	16.7 (1) <sup>aC</sup>	25 (1) <sup>aC</sup>	30 (3) <sup>aD</sup>	44.44 (4) <sup>aD</sup>
	Deitadas/ Eretas	0 <sup>bA</sup>	22.23 (2) <sup>bB</sup>	0 <sup>bA</sup>	25 (1) <sup>aB</sup>	20 (2) <sup>aB</sup>	11.11 (1) <sup>bB</sup>
Mit	Eretas	0 <sup>bA</sup>	77.77 (7) <sup>cB</sup>	83.3 (5) <sup>cB</sup>	50 (2) <sup>bC</sup>	50 (5) <sup>bC</sup>	44.44 (4) <sup>aC</sup>
	Córtex	100 (4) <sup>aA</sup>	0 <sup>aB</sup>	0 <sup>aB</sup>	0 <sup>aB</sup>	20 (2) <sup>aC</sup>	33.33 (3) <sup>aC</sup>
GC	Ligeiramente dispersas	0 <sup>bA</sup>	22.23 (2) <sup>bB</sup>	100 (6) <sup>bC</sup>	50 (2) <sup>bD</sup>	20 (2) <sup>aB</sup>	22.22 (2) <sup>aB</sup>
	Dispersas	0 <sup>bA</sup>	77.77 (7) <sup>cB</sup>	0 <sup>aA</sup>	50 (2) <sup>bC</sup>	60 (6) <sup>bB</sup>	44.44 (4) <sup>bD</sup>
GC	Grumos	100 (4) <sup>aA</sup>	11.12 (1) <sup>aB</sup>	50 (3) <sup>aC</sup>	0 <sup>aD</sup>	20 (2) <sup>aB</sup>	11.11 (1) <sup>aB</sup>
	Alinhando	0 <sup>bA</sup>	33.33 (3) <sup>bB</sup>	50 (3) <sup>aB</sup>	50 (2) <sup>bB</sup>	40 (4) <sup>bB</sup>	44.44 (4) <sup>bB</sup>
	Alinhados	0 <sup>bA</sup>	55.55 (5) <sup>cB</sup>	0 <sup>bA</sup>	50 (2) <sup>bB</sup>	40 (4) <sup>bB</sup>	44.44 (4) <sup>bB</sup>

CC, células do cumulus; PvS, espaço perivitelínico; Mv, microvilosidades; Mit, mitocôndrias; GC, grânulos corticais.

Os dados estão expressos em porcentagem de CCOs analisados e o número está descrito entre parênteses.

<sup>a,b,c</sup> Letras minúsculas indicam diferenças entre as características de maturação citoplasmática dentro do mesmo grupo experimental (P<0,0001)

<sup>A,B,C,D</sup> Letras maiúsculas indicam diferenças dentro da mesma característica de maturação citoplasmática e entre os diferentes grupos experimentais (P<0.05)



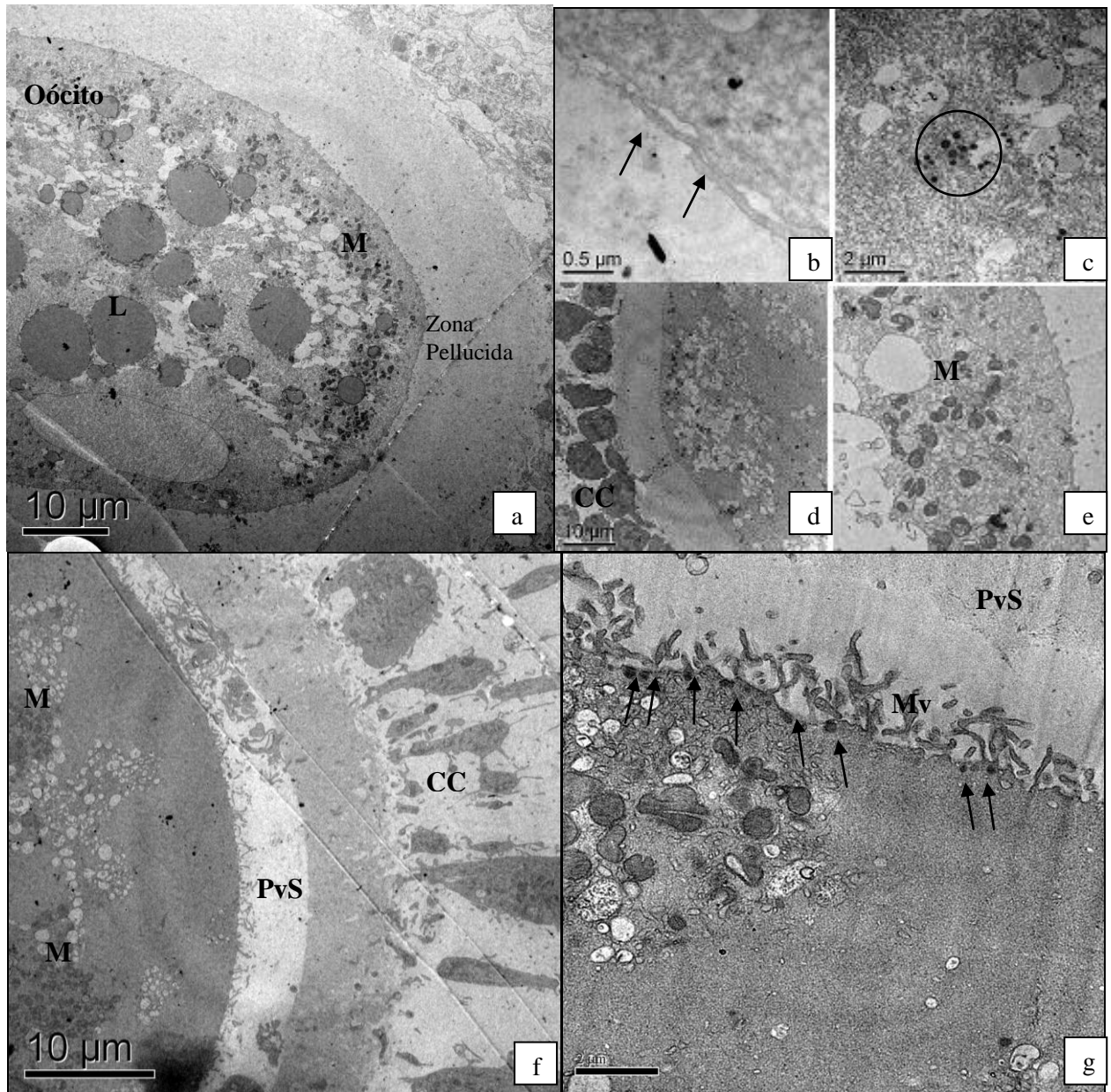


Fig. 4. Ultra-estrutura de CCOs bovinos imaturos (0h)- Fig. a-e; e cultivados em meio de maturação padrão por 24h (T24)- Fig. f e g.

a) Observe as mitocôndrias (M) no córtex do oócito e as gotas de lipídeos (L). 2000x.

b) Observe as microvilosidades deitadas (setas). 50000x

c) Observe o grupo de grânulos corticais (círculo). 15000x.

d) Observe as células do *cumulus* (CC) compactas. 2500x.

e) Observe as mitocôndrias (detalhe da fig. a). 5000x.

f) Observe a distribuição das mitocôndrias (M) pelo citoplasma, o espaço perivitelínico (PvS) desenvolvido e as células do *cumulus* (CC) expandidas. 3000x.

g) Observe os grânulos corticais alinhados (setas) e as microvilosidades (Mv) eretas. 10000x.

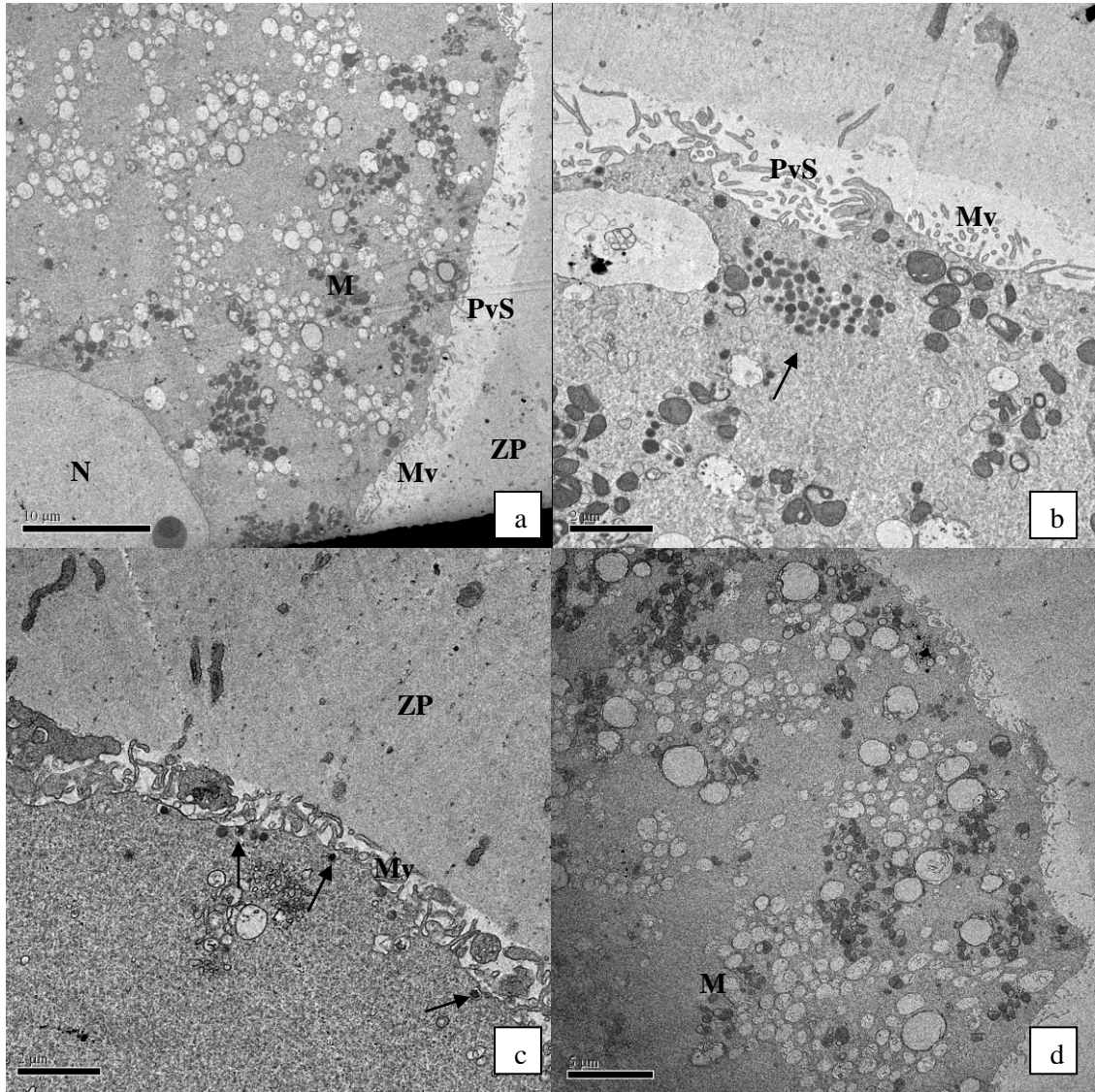


Fig. 5. Ultra-estrutura de CCOs bovinos cultivados em MIV-B por 24h (B24).

- a) Observe a disposição das mitocôndrias (M) na região cortical do oócito, o pequeno espaço perivitelínico (PvS), as microvilosidades (Mv) eretas e o núcleo (N). 3000x.
- b) Note o grupo de grânulos corticais (GC) (seta), o pequeno PvS e as Mv eretas. 10000x.
- c) Observe os GC alinhados (setas) e as Mv deitadas/eretas (Mv). 10000x.
- d) Observe o início da distribuição das mitocôndrias pelo citoplasma (M). 4000x.

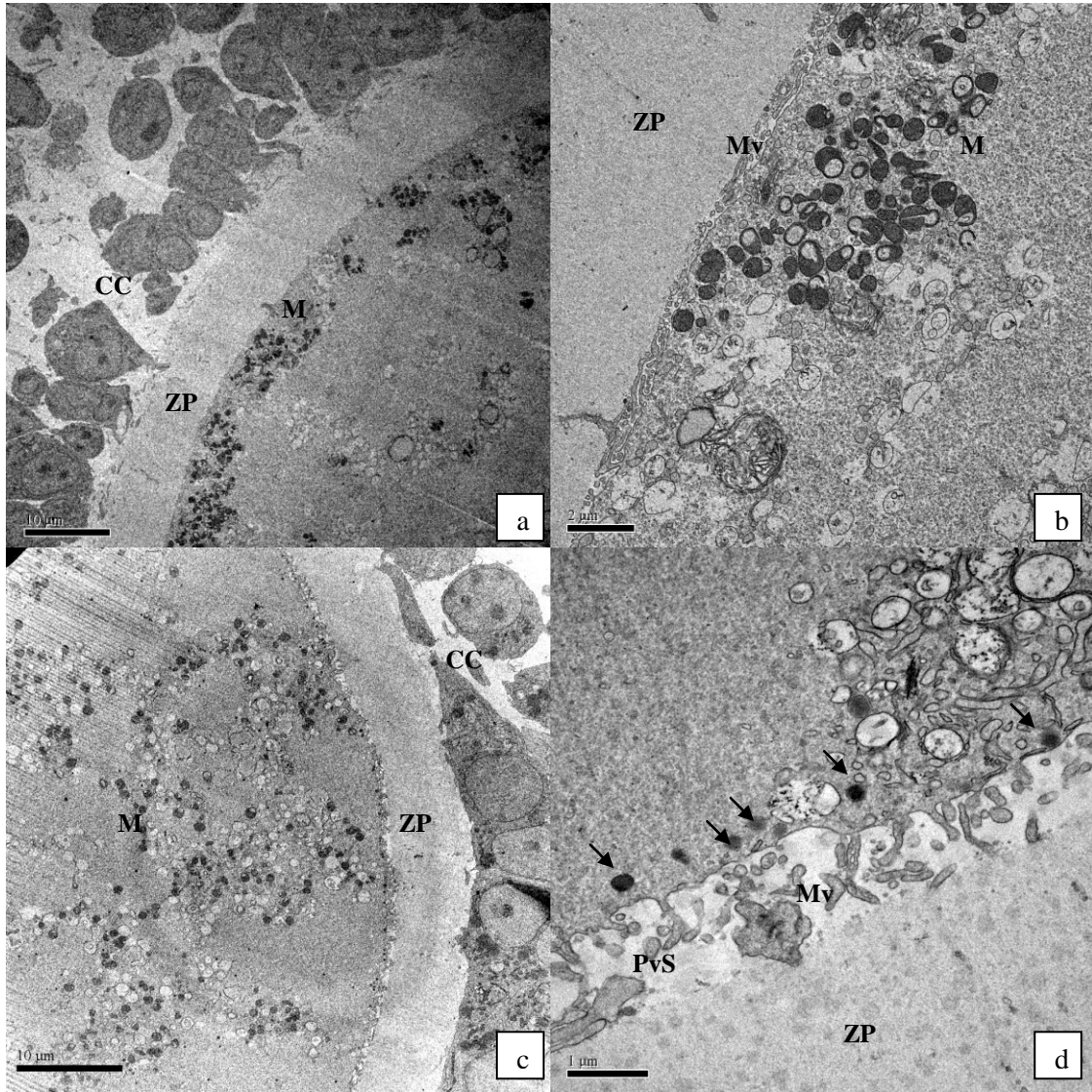


Fig. 6. Ultra-estrutura de CCOs bovinos cultivados em MIV-B por 48h (B48).

- a) Observe que as mitocôndrias (M) estão localizadas na região cortical do oócito e as células do *cumulus* estão compactas. 2000x.
- b) Observe as mitocôndrias (M) no córtex do oócito e as microvilosidades (Mv) deitadas. 8000x.
- c) Observe que as células do *cumulus* estão compactas (CC) e as mitocôndrias estão dispersas pelo citoplasma. 2500x.
- d) Observe os grânulos corticais alinhados (setas) e as microvilosidades (Mv) eretas. 20000x.

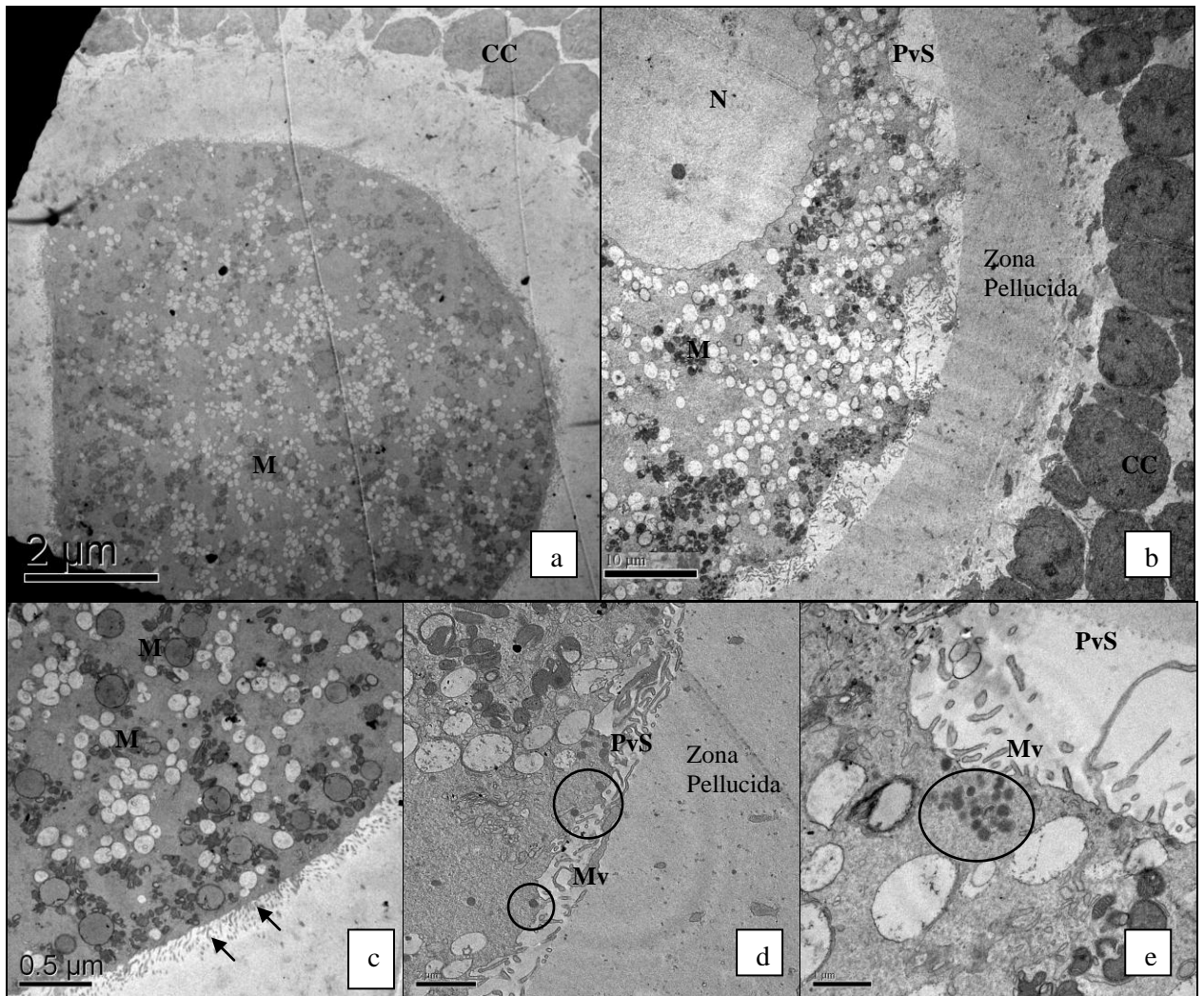


Fig. 7. Ultra-estrutura de CCOs bovinos cultivados em MIV-C por 24h (C24).

- Observe as mitocôndrias dispersas por todo o citoplasma (pontos escuros-M) e as células do *cumulus* compactas (CC). 1500x.
- Observe o núcleo (N), as mitocôndrias ligeiramente dispersas pelo citoplasma (M), o pequeno espaço perivitelínico (PvS) e as células do *cumulus* compactas. 2000x.
- Observe as microvilosidades eretas (setas) e as mitocôndrias (M). 5000x.
- Observe os grânulos corticais alinhados (círculos), as microvilosidades (Mv) deitadas/eretas e o pequeno PvS. 10000x.
- Observe o grumo de grânulos corticais (círculos e as microvilosidades (Mv) eretas). 10000x.

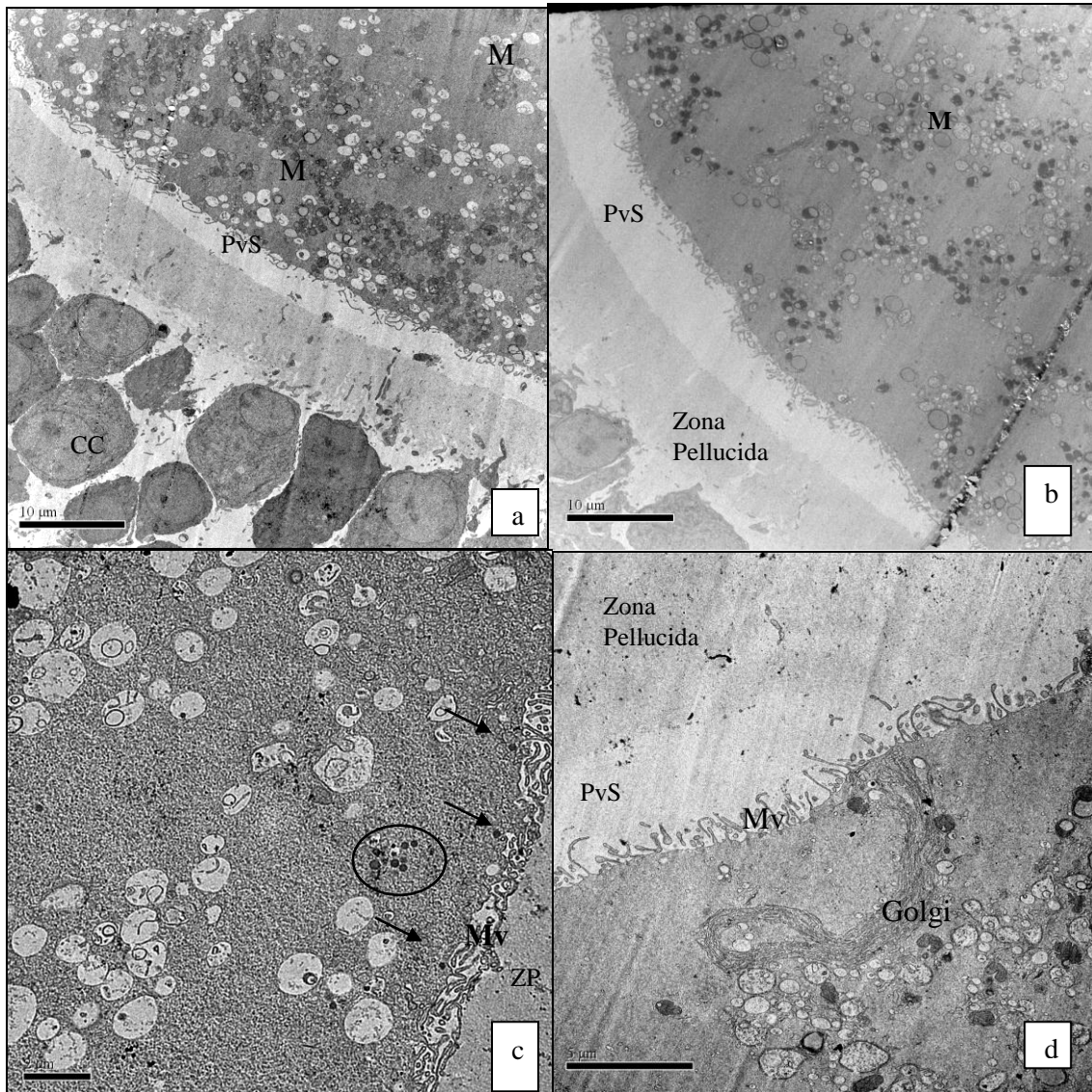


Fig. 8. Ultra-estrutura de CCOs bovinos cultivados em MIV-C por 48h (C48).

- a) Observe as mitocôndrias (M) ligeiramente dispersas (pontos escuros), as células do *cumulus compacta* e o pequeno PvS. 2500x.  
 b) Observe as mitocôndrias (M) dispersas pelo citoplasma e o espaço perivitelínico (PvS) desenvolvido. 2500x.  
 c) Observe os grânulos corticais se alinhando (círculo e setas) e as microvilosidades (Mv) deitadas. 8000x.  
 d) Observe o PvS desenvolvido e as microvilosidades eretas. 6000x.

Os resultados a seguir são da quantificação da expressão gênica dos CCOs cultivados em meio de maturação controle (T24 com CP), ou cultivados por 24 ou 48h em MIV-C e estão mostrados nas figuras 9 - 12. Oócitos imaturos (tempo 0h) ou maduros (T24 CP, C24 CP e B24 CP) foram usados como grupos normalizadores (valor = 1).

Foi observado que na análise do gene relacionado ao estresse térmico, HSP70.1, oócitos imaturos (sem CP) apresentaram maior abundância relativa do que oócitos maduros tanto quando comparados ao normalizador imaturo (tempo 0h), quanto quando comparados ao normalizador maduro (T24 CP) (Figs. 9a e 9b). Os oócitos imaturos cultivados por 24 ou 48h em MIV-C foram semelhantes aos oócitos imaturos do tempo zero (Fig. 9a). Os oócitos maduros cultivados em MIV-C por 24h ou 48h foram semelhantes aos oócitos maduros cultivados por 24h em meio de maturação controle (T24CP) (Fig.9b).

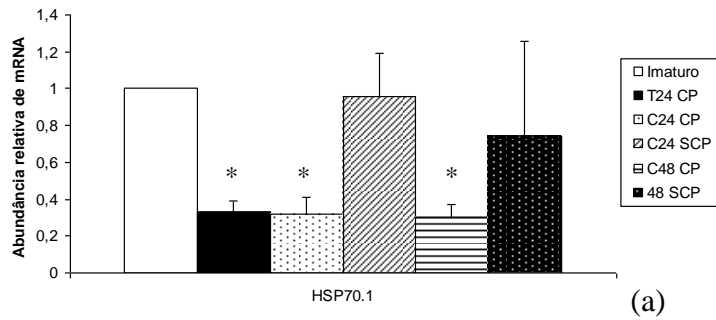
Quando os grupos imaturos C24 SCP e C48 SCP foram comparados aos normalizadores maduros C24 CP e C48 CP respectivamente, foi observada uma maior abundância relativa por parte dos imaturos, tanto com o cultivo de 24 quanto com o cultivo de 48 horas (Figs. 9c e 9d).

Na análise do gene relacionado ao estresse oxidativo, PRDX1, os oócitos maduros (com CP) de todos os tratamentos também apresentaram menor abundância relativa em relação aos imaturos (Fig. 10a). Dos oócitos imaturos (C24 SCP e C48 SCP), o grupo cultivado por 24h apresentou expressão semelhante à observada no grupo imaturo controle, porém os oócitos cultivados por 48h apresentaram menor abundância relativa em relação ao normalizador imaturo (Fig. 10a), sendo semelhante ao normalizador maduro. (Fig. 10b). Quando todos os grupos foram comparados ao normalizador maduro, observou-se que somente o grupo C24 SCP apresentou maior abundância relativa do gene PRDX1 (Fig. 10b). Na comparação entre os grupos cultivados em meio definido (C24CP X C24SCP e C48CP X C48SCP), os oócitos imaturos do grupo cultivado por 24 horas (C24SCP) apresentaram maior abundância relativa (Fig. 10c). Já o grupo cultivado por 48 horas não apresentou diferença na abundância de mRNA (Fig. 10d).

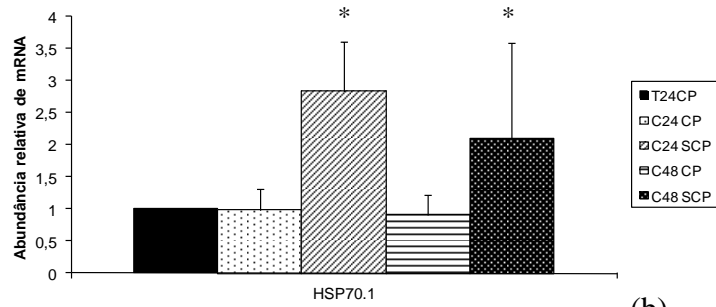
A expressão do gene do receptor de IGF1 (IGF1R) foi semelhante em todos os grupos analisados quando comparados aos normalizadores imaturo (tempo 0h) e maduro (T24 CP, C24 CP e B24 CP) (Figs. 11a - 11d).

A quantificação do gene GDF9 mostrou que o grupo imaturo C24SCP apresentou-se semelhante ao normalizador imaturo (Fig. 12a), enquanto que C48SCP, também imaturo, apresentou-se semelhante ao normalizador maduro (Fig. 12b).

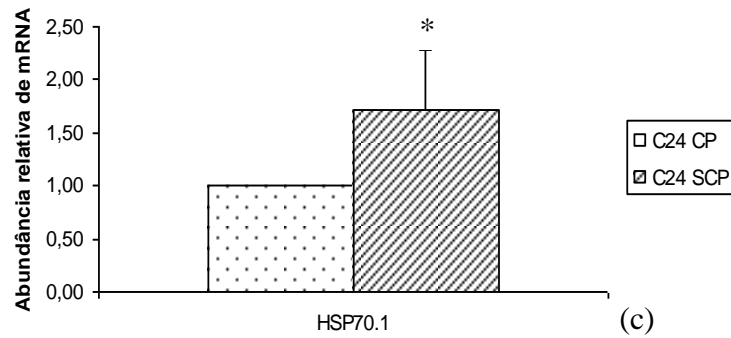
Quando comparados ao normalizador maduro, os oócitos cultivados por 24 em MIV-C, tanto maduros (C24 CP) quanto imaturos (C24 SCP), apresentaram expressão aumentada em relação ao controle maduro. Na comparação entre os grupos cultivados em meio definido por 24 ou 48h (Figs. 12c e 12d), uma maior abundância relativa foi encontrada somente para o tempo de 24h no grupo imaturo (C24SCP) em relação ao maduro (C24CP).



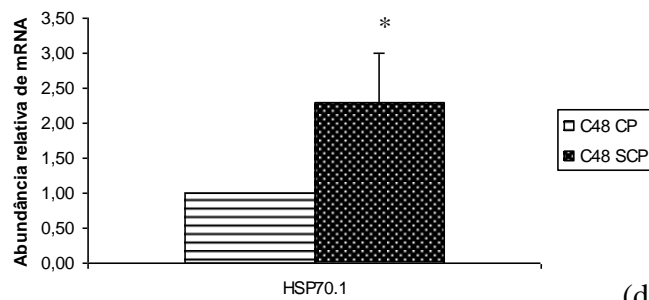
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 9. Abundância relativa do gene *HSP70.1* em óocitos bovinos cultivados em MIV-C.

a) O grupo imaturo (0h) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).

b) O grupo T24 CP (maduro) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).

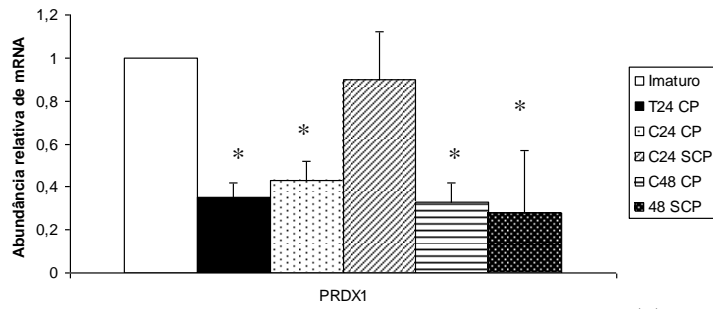
c) O grupo C24CP (maduro) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).

d) O grupo C48CP (maduro) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).

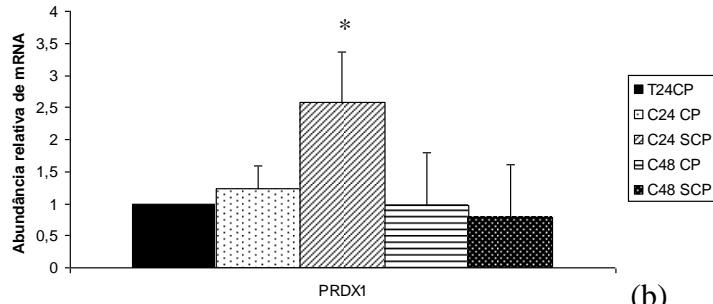
Resultados demonstrados como média  $\pm$  erro padrão.

\* Indica diferença na comparação com o normalizador ( $p < 0,05$ ).

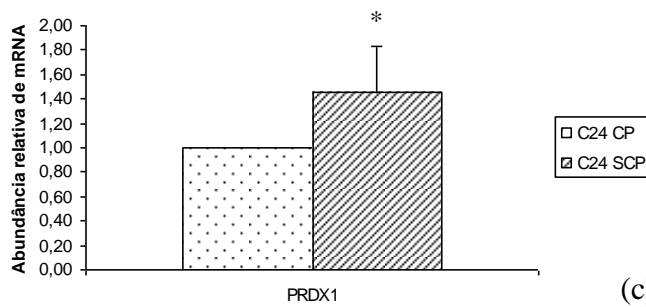




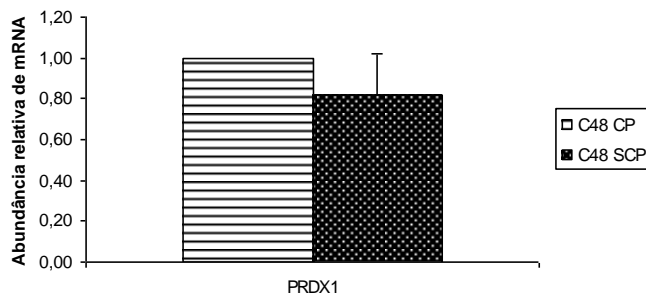
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 10. Abundância relativa do gene *PRDX1* em óocitos bovinos cultivados em MIV-C.

a) O grupo imaturo (0h) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).

b) O grupo T24 CP (maduro) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).

c) O grupo C24CP (maduro) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).

d) O grupo C48CP (maduro) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).

Resultados demonstrados como média  $\pm$  erro padrão.

\* Indica diferença na comparação com o normalizador ( $p < 0,05$ ).

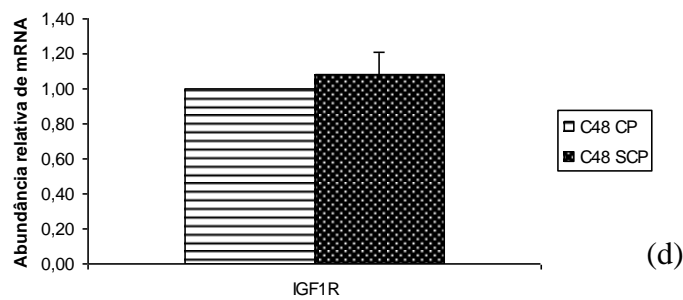
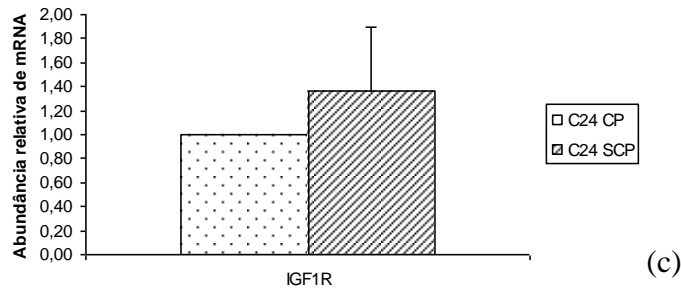
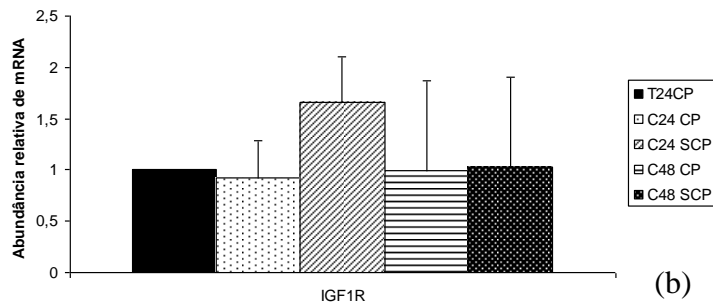
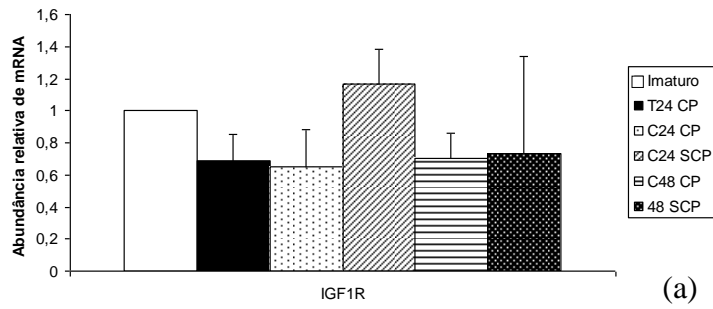


Fig. 11. Abundância relativa do gene *IGF1R* em oócitos bovinos cultivados em MIV-C.  
 a) O grupo imaturo (0h) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).  
 b) O grupo T24 CP (maduro) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).  
 c) O grupo C24CP (maduro) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).  
 d) O grupo C48CP (maduro) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).  
 Resultados demonstrados como média  $\pm$  erro padrão.  
 \* Indica diferença na comparação com o normalizador ( $p < 0,05$ ).

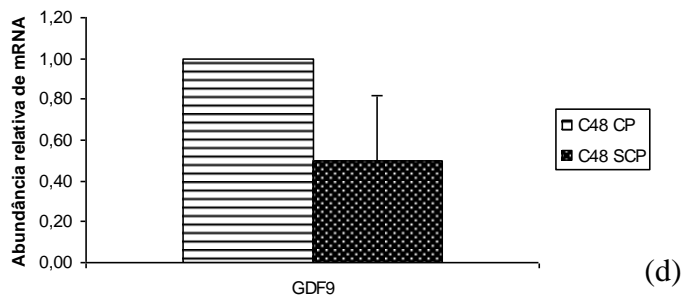
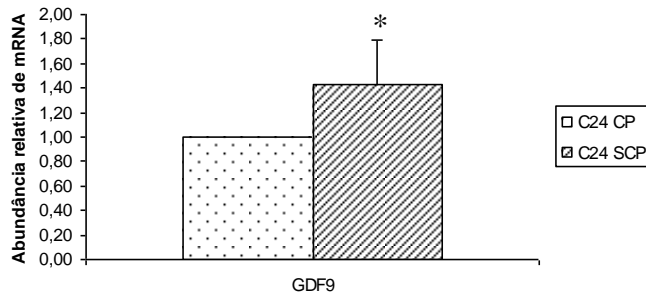
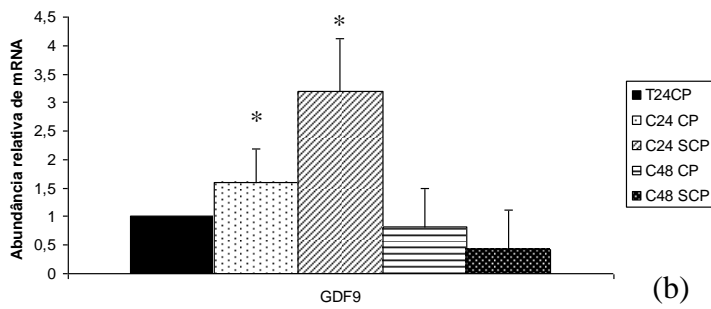
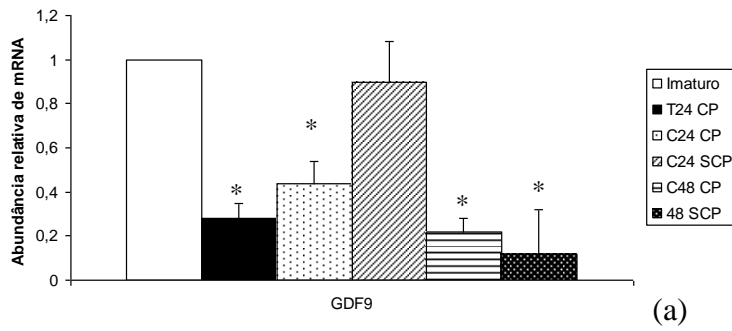


Fig. 12. Abundância relativa do gene *GDF9* em óocitos bovinos cultivados em MIV-C.

a) O grupo imaturo (0h) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).

b) O grupo T24 CP (maduro) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).

c) O grupo C24CP (maduro) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).

d) O grupo C48CP (maduro) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).

Resultados demonstrados como média  $\pm$  erro padrão.

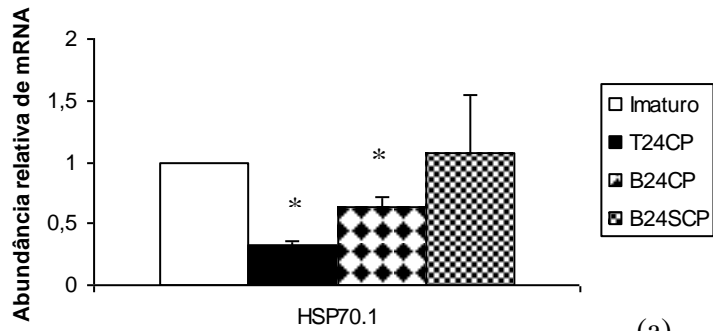
\* Indica diferença na comparação com o normalizador ( $p < 0,05$ ).

Os resultados da quantificação da expressão gênica dos CCOs cultivados por 24h em MIV-B estão mostrados nas figuras 13-16. Oócitos imaturos (tempo 0h) e maduros (T24 CP ou B24 CP) foram usados como grupos normalizadores (valor = 1).

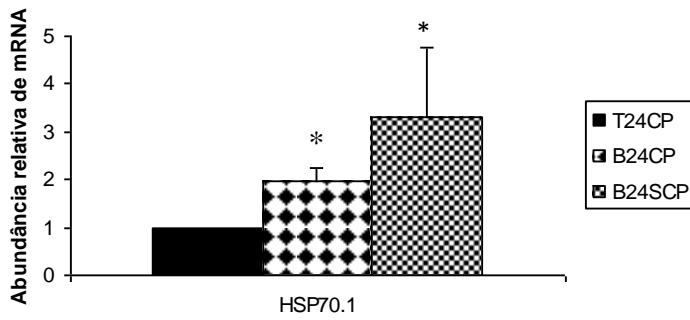
Para os genes relacionados ao estresse (HSP70.1 e PRDX1) o resultado da quantificação foi bem parecido (Figs. 13 e 14). Em ambos os casos oócitos imaturos (tempo 0h e B24SCP) apresentaram maior abundância relativa do que oócitos maduros (T24CP e B24CP), sendo que B24SCP foi semelhante ao normalizador imaturo (Figs. 13a e 14a). Os oócitos cultivados em MIV-B, tanto os maduros (B24CP) quanto os imaturos (B24SCP), apresentaram maior abundância relativa quando comparados ao normalizador maduro (T24CP) (Figs.13b e 14b). Na comparação entre os dois grupos cultivados em meio definido (B24CP e B24SCP), os oócitos imaturos apresentaram maior abundância relativa (Figs.13c e 14c).

Na análise do gene IGF1R foi observado que os oócitos cultivados por 24h em MIV-B (B24CP e B24SCP) apresentaram maior abundância relativa do que os oócitos cultivados em meio de maturação controle (T24CP) (Fig. 15b). No entanto, o resultado encontrado para o cultivo em meio definido foi semelhante ao encontrado para o normalizador imaturo (Fig. 15a). Na comparação entre os dois grupos cultivados em meio definido (B24CP e B24SCP), os oócitos imaturos apresentaram maior abundância relativa (Fig.15c).

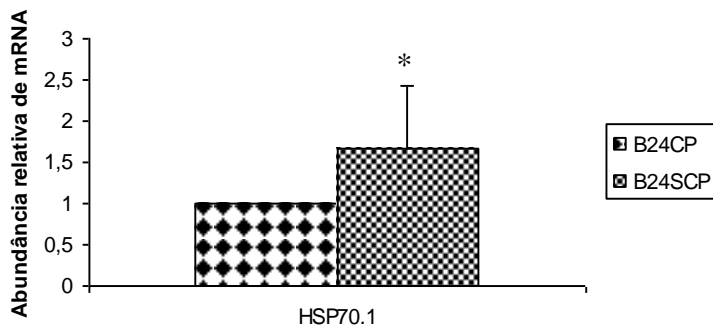
O resultado da expressão do gene GDF9 (Fig. 16) mostrou que todos os grupos apresentaram menor abundância relativa em relação ao normalizador imaturo (Fig.16a). No entanto, em relação ao normalizador maduro, os oócitos cultivados em MIV-B (B24CP e B24SCP) apresentaram maior expressão (Fig.16b). Na comparação entre os dois grupos cultivados em meio definido (B24CP e B24SCP), os oócitos imaturos apresentaram maior abundância relativa (Figs. 16c, 16d).



(a)



(b)



(c)

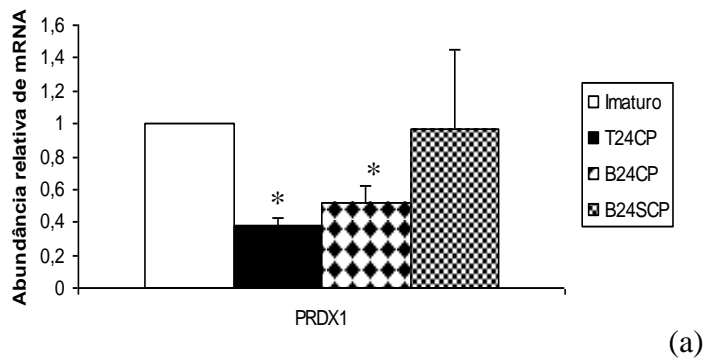
Fig. 13. Abundância relativa do gene *HSP70.1* em óocitos bovinos cultivados em MIV-B.

a) O grupo imaturo (0h) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).

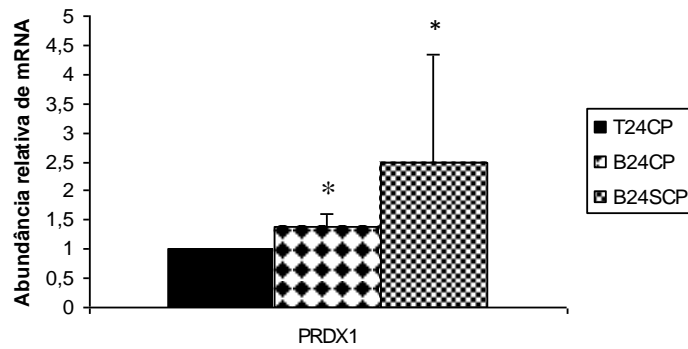
b) O grupo T24 CP (maduro) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).

c) O grupo B24CP foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1). Resultados demonstrados como média  $\pm$  erro padrão.

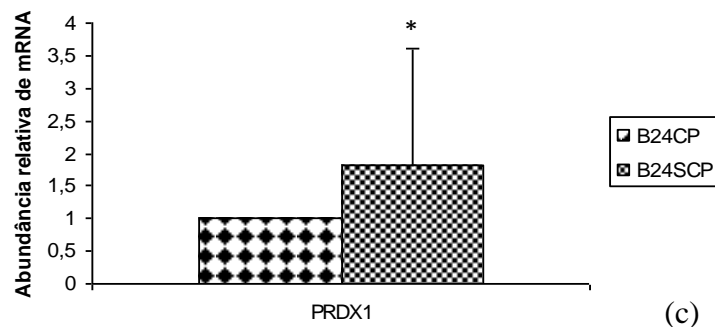
\* Indica diferença na comparação com o normalizador ( $p < 0,05$ ).



(a)



(b)



(c)

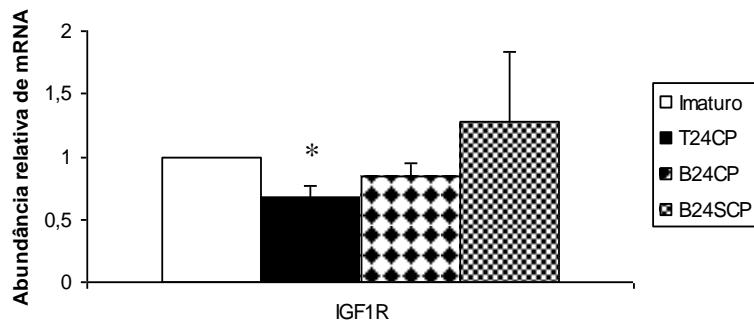
Fig. 14. Abundância relativa do gene *PRDX1* em óocitos bovinos cultivados em MIV-B.

a) O grupo imaturo (0h) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).

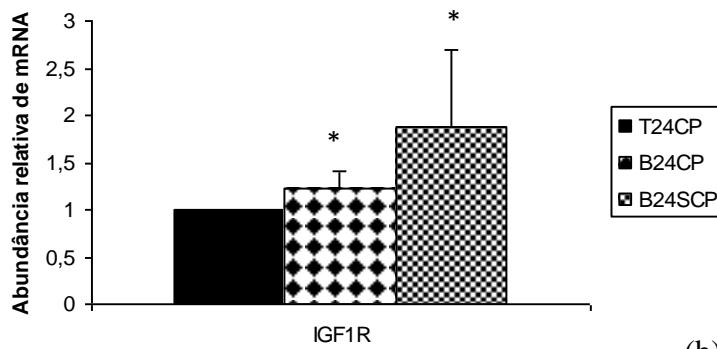
b) O grupo T24 CP (maduro) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).

c) O grupo B24CP foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1). Resultados demonstrados como média  $\pm$  erro padrão.

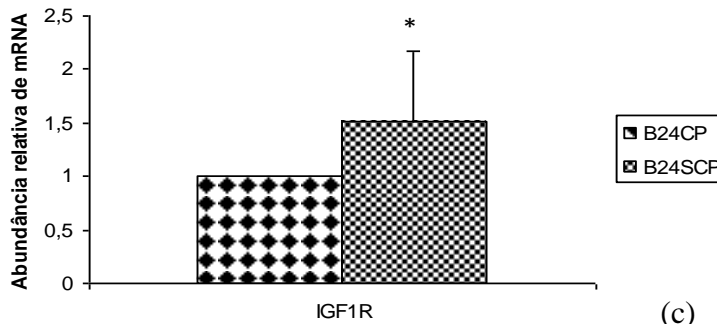
\* Indica diferença na comparação com o normalizador ( $p < 0,05$ ).



(a)



(b)



(c)

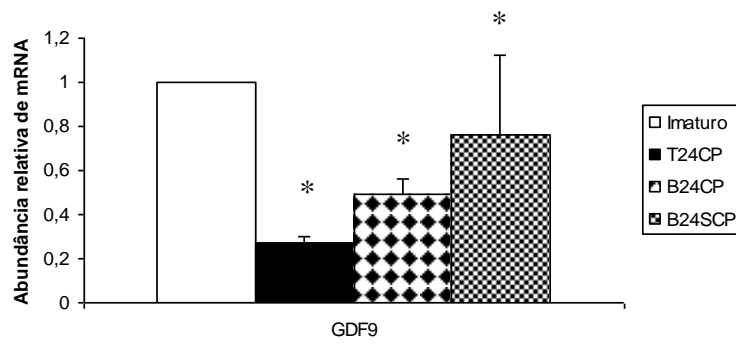
Fig. 15. Abundância relativa do gene *IGF1R* em oócitos bovinos cultivados em MIV-B.

a) O grupo imaturo (0h) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).

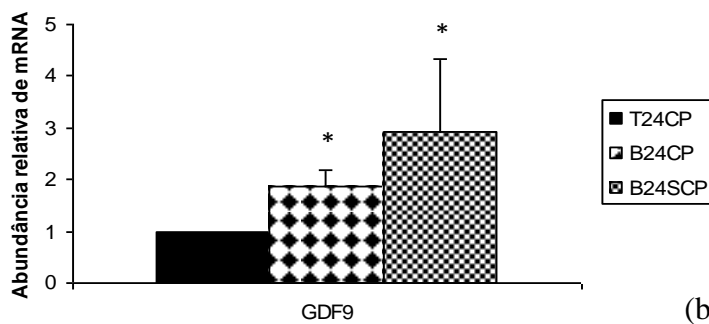
b) O grupo T24 CP (maduro) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).

c) O grupo B24CP foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1). Resultados demonstrados como média  $\pm$  erro padrão.

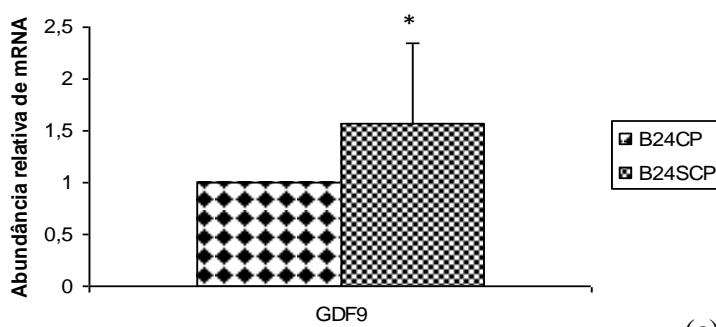
\* Indica diferença na comparação com o normalizador ( $p < 0,05$ ).



(a)



(b)



(c)

Fig. 16. Abundância relativa do gene *GDF9* em óocitos bovinos cultivados em MIV-B.

a) O grupo imaturo (0h) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).

b) O grupo T24 CP (maduro) foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1).

c) O grupo B24CP foi utilizado como grupo normalizador (valor igual a 1). Resultados demonstrados como média  $\pm$  erro padrão.

\* Indica diferença na comparação com o normalizador ( $p < 0,05$ ).



## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Maturação Nuclear

Baseado no presente estudo foi concluído que o cultivo *in vitro* de CCOs bovinos imaturos em meio estritamente definido (MIV-B e MIV-C) por 24 horas bloqueou a maturação nuclear (meiose) em uma taxa aproximada de 70%.

De acordo com um estudo previamente realizado (Anexo B), a reversão dessa inibição foi alcançada pelo cultivo adicional dos CCOs em meio de maturação controle (TCM-199) por um período de 24h (OLIVEIRA e SILVA *et al*, 2011). No entanto, o mesmo resultado não foi obtido com o cultivo adicional no meio MIV-C (Fig.2b).

Uma variação do meio MIV-C, o MIV-B, foi testada e também promoveu a inibição da meiose em cerca de 70% dos CCOs cultivados por 24h. O cultivo adicional de 24h no meio MIV-B mostrou que a taxa de oócitos maduros após 32h de cultura ficou em torno de 50%, ou seja, mais que dobrou em relação às primeiras 24 horas de cultivo.

A remoção do oócito do ambiente folicular e conseqüentemente da presença dos fatores inibitórios lá presentes faz com que o oócito tenha a meiose retomada (SIRARD *et al*, 1998).

Talvez a manutenção do bloqueio meiótico induzido pelas condições de cultivo possa promover um tempo adicional para que os oócitos sofram modificações ultraestruturais e moleculares necessárias para a aquisição de competência (MACHATKOVA *et al*, 2004). Muitos moduladores químicos da progressão meiótica têm sido testados para esse propósito, como inibidores de síntese proteica e inibidores da atividade quinase. No entanto foi observado que a taxa de produção de blastocistos diminui com a utilização desses moduladores (DODE *et al*, 2001; LONERGAN *et al*, 1997).

No presente estudo, o bloqueio da meiose foi promovido por meios de cultivo estritamente definidos (MIV-B e MIV-C) sem o uso de moduladores da divisão celular. No caso do MIV-C, pode-se dizer que o bloqueio promovido não causou nenhum dano no processo maturacional, uma vez que a inibição foi completamente revertida após o cultivo adicional em

TCM-199 (OLIVEIRA e SILVA *et al*, 2011). Já com o MIV-B, o bloqueio foi parcialmente revertido após cultivo adicional nele mesmo. No entanto, o cultivo adicional em TCM-199 após 24h de cultivo em MIV-B não foi realizado neste estudo.

A aquisição de competência por parte dos oócitos é influenciada pelo meio de maturação e seus suplementos (LONERGAN *et al*, 2003). Existe uma grande variação em relação à composição dos meios de cultura entre os grupos de pesquisa. Embora o soro fetal bovino (SFB) seja comumente adicionado ao meio de MIV, ele contém muitos componentes desconhecidos que podem introduzir uma enorme variabilidade fisiológica ao sistema de MIV, o que impede a padronização necessária para obtenção de uma resposta consistente (CHIAN *et al*, 2003).

A busca pelo desenvolvimento de um meio de maturação *in vitro* de oócitos que seja quimicamente definido e promova uma comparação válida entre maturação *in vivo* e *in vitro* e assim a produção de embriões *in vitro* nas mesmas taxas e qualidade das obtidas *in vivo*, foi o que motivou esse trabalho.

O cultivo de células da granulosa em MIV-C, meio quimicamente definido que possui hormônios, anti-oxidantes e fatores de crescimento em sua constituição, apresentou por um período prolongado, a secreção de estradiol, mimetizando um folículo em crescimento (MONTREZOR *et al*, 2002). Collares *et al*, (2003) ainda observou que a ultraestrutura das células da granulosa cultivadas em MIV-C é semelhante à de células com potencial estrogênico preservado, ao contrário do observado nas células cultivadas em meio controle as quais se apresentaram luteinizadas.

Em um estudo prévio (SILVA, 2008), a dosagem dos hormônios estradiol (E2) e progesterona (P4) presente no meio após 24h de cultivo de CCOs em TCM-199+SFB (controle) ou em MIV-C foi realizada. O resultado mostrou que a secreção de E2 foi significativamente maior no grupo cultivado em MIV-C, onde as células do *cumulus* secretaram durante as 24 horas de cultura 2444,24 pg/mL enquanto o grupo controle secretou apenas 40,99 pg/mL desse hormônio. Já a secreção de P4 foi maior no grupo controle (19,3 ng/mL) em comparação ao grupo cultivado em MIV-C (3,4 ng/mL).

Sugere-se, portanto que o ambiente proporcionado pelo cultivo dos CCOs em MIV-C seja mais parecido com o ambiente de um folículo em crescimento *in vivo* do que aquele promovido pelo cultivo dos CCOs em meio controle.

Sugere-se que o cultivo de CCOs (células do *cumulus* e oócitos) em MIV-C tenha promovido a inibição da maturação nuclear até que o pico de gonadotrofinas, representado pelo cultivo em TCM-199+SFB, o qual possui soro e FSH em sua constituição, promovesse a reversão do bloqueio meiótico, mimetizando uma ovulação.

O desbloqueio da inibição meiótica que não foi alcançado após as 48h de cultivo em MIV-C pode sugerir que esse sistema de cultivo mimetiza um folículo em crescimento, onde as células do cumulus que se encontram compactadas durante todo o cultivo produzem o fator inibidor da meiose, mantendo a meiose bloqueada até que haja o pico de LH (OLIVEIRA e SILVA *et al*, 2011).

O cultivo de CCOs em um meio de cultura quimicamente definido, suplementado apenas com PVA, aminoácidos não essenciais e antioxidantes, sem a adição de hormônios e fatores de crescimento (MIV-B) também foi capaz de induzir a inibição da meiose. Tal fato pode decorrer de o meio MIV-B conseguir manter a viabilidade e a atividade das células foliculares em produzir o fator inibidor da meiose por um tempo. O posterior desbloqueio parcial da inibição meiótica pode ser devido ao consumo desse fator inibitório com o tempo de cultivo, sem que esse fosse repostado, uma vez que essa formulação (MIV-B) não contém os “aditivos” que seriam responsáveis por sustentar a atividade celular mimética à de um folículo em crescimento.

A composição básica dos meios de cultura é: água ultra-pura, íons em concentração próxima à encontrada no sangue, substratos energéticos e proteicos.

A formulação comercial do meio Alpha-MEM (Anexo C) possui uma alta concentração de aminoácidos, além dele ainda ter sido suplementado com uma solução de aminoácidos não essenciais que contém 100X a concentração de aminoácidos não essenciais encontrada no meio Alpha-MEM.

O fluido folicular apresenta concentrações de aminoácidos semelhantes às presentes no plasma (GUÉRIN *et al*, 1995). Altas concentrações de aminoácidos presentes nos meios de maturação, no entanto, são benéficas por regular o metabolismo (LANE & GARDNER, 1998) e a síntese proteica (KURAN *et al*, 2002) e por conferir proteção contra o estresse oxidativo (LINDENBAUM, 1973). Essa alta concentração também resulta na produção de amônia como resultado da degradação espontânea e catabolismo, embora seja pouco provável que esta se acumule em nível tóxico num período de 24h de maturação (ORSI & LEESE, 2004; HAMMON *et al*, 2000 a,b). Entretanto, por um período prolongado talvez possa ser prejudicial.

Glicose, lactato, piruvato e aminoácidos são pré-requisitos para maturação e fertilização *in vitro* de oócitos bovinos. O metabolismo oxidativo do piruvato e dos aminoácidos é a principal via de geração de energia em oócitos bovinos para esses processos, sendo que piruvato e glicose suportam a demanda da maturação e os aminoácidos a formação pronuclear dos oócitos fertilizados (Rieger & Loskutoff 1994; Lim *et al*. 1999).

Tem sido proposto que os aminoácidos estão entre os mais importantes reguladores do desenvolvimento embrionário inicial e, portanto constituintes chaves dos meios de cultura

(GARDNER *et al*, 1996). Estudos demonstram que eles mantêm a função celular, estimulam o desenvolvimento e diferenciação embrionária *in vitro* e aumentam o potencial de desenvolvimento embrionário *in vivo*. Os mecanismos de ação propostos indicam que são precursores anabólicos das proteínas atuando como reguladores do metabolismo energético, da osmolaridade e do pH, atuando como tampão (GARDNER *et al*, 2012).

Foram encontradas no fluido uterino humano concentrações de vários aminoácidos mais elevadas do que as encontradas no plasma. Tal fato pode resultar da secreção endometrial ativa regulada por esteróides ovarianos e exemplifica a importância desses constituintes para o desenvolvimento embrionário inicial. Um estudo mostra que a exposição de zigotos de camundongo por cerca de 5 minutos em meio sem aminoácidos prejudica significativamente o subsequente potencial de desenvolvimento embrionário (GARDNER *et al*, 1996).

Similarmente, outro grupo de pesquisa demonstrou que a expressão gênica em embriões de camundongo cultivados na presença de aminoácidos foi comparável à de embriões desenvolvidos *in vivo*. (HO *et al*, 1995). Ao contrário, o cultivo embrionário na ausência de aminoácidos exibiu expressão gênica aberrante (DOHERTY *et al*, 2000).

Ainda existem muitas controvérsias a respeito dos efeitos dos aminoácidos no período pré-implantação. Isso porque a mensuração dos níveis desses compostos *in vivo* é muito difícil de ser realizada ao contrário do que acontece nos estudos *in vitro*.

## **6.2. Maturação Citoplasmática**

### **6.2.1. Rearranjo de organelas citoplasmática**

A maturação *in vitro* de oócitos bovinos frequentemente promove uma maturação citoplasmática anormal, ou incompleta que leva a falhas na aquisição de competência oocitária. Tal fato se deve em parte ao meio nutricional não fisiológico ao qual os oócitos são expostos durante o cultivo.

O rearranjo das organelas citoplasmáticas inclui uma sucessão de transformações necessárias à progressão da maturação e ao bloqueio da polispermia, e está altamente relacionado ao estágio da meiose no qual o oócito se encontra.

Alguns parâmetros como o padrão de distribuição das mitocôndrias e dos grânulos corticais estão bem estabelecidos em relação ao grau de maturação nuclear (HYTTEL *et al*, 1997; TORNER *et al*, 2004).

O presente estudo mostrou que embora os meios MIV-B e MIV-C promovam a inibição da meiose nas primeiras 24h de cultivo em cerca de 70% dos oócitos analisados, a distribuição de algumas organelas, observada na ultraestrutura dos CCOs, ficou em um estágio intermediário entre os padrões imaturo, representado por CCOs fixados logo após a aspiração folicular (0h) e o padrão maduro, representado por CCOs cultivados em meio de maturação controle (T24).

Foi observado o padrão de distribuição mitocondrial ligeiramente disperso com 24h de cultivo em MIV-C. Às 48h de cultivo, embora a meiose ainda se encontrasse bloqueada, 50% dos CCOs analisados apresentaram mitocôndrias dispersas pelo citoplasma. Após 24h de cultivo em MIV-B, o padrão observado foi semelhante ao grupo T24 (controle maduro), embora a meiose estivesse bloqueada (Tabela 2).

As mitocôndrias desempenham um papel vital na maquinaria que provê ATP para a fertilização e o desenvolvimento embrionário. Estudos indicam que o nível de ATP e a distribuição mitocondrial no oócito durante a maturação estão altamente correlacionados com a morfologia e a capacidade de desenvolvimento após a fertilização *in vitro* (STOJKOVIC *et al*, 2001).

Os oócitos de mamíferos contêm cerca de 100.000 mitocôndrias (JANSEN *et al*, 1998). É um fato bem estabelecido que as mitocôndrias constituem o centro de energia das células pelo fornecimento de ATP. Além disso, são também responsáveis por vários processos intracelulares importantes, como a homeostase do  $Ca^{2+}$  que atua na sinalização celular, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), reduzindo a formação de metabólitos intracelulares, e do controle da apoptose (DUMOLLARD *et al*, 2007).

Na investigação da atividade mitocondrial de oócitos e embriões até o estágio de blastocisto foi observado que o consumo de oxigênio acompanha eventos fisiológicos importantes tais como o desenvolvimento, a resposta aos metabólitos do meio e à morte celular (TRIMARCHI, *et al*, 2000) e sugere que a atividade mitocondrial é crucial para a ativação do desenvolvimento e para a sobrevivência embrionária (DUMOLLARD *et al*, 2007).

O DNA mitocondrial é responsável por codificar componentes essenciais da maquinaria da fosforilação oxidativa (TAANMAN, 1999). Rearranjos no DNA mitocondrial comuns com o aumento da idade podem se acumular nos oócitos o que leva à disfunção do processo de fosforilação oxidativa e conseqüentemente à incapacidade de produção de energia.

Sabendo que as cerca de 100.000 mitocôndrias presentes no oócito não se replicam no período pré-implantacional, são apenas distribuídas entre as células do blastocisto (DUMOLLARD *et al*, 2006) e que são responsáveis pela produção de energia requerida desde a

retomada da meiose, fertilização até o desenvolvimento embrionário inicial, percebe-se a importância dessas organelas no processo reprodutivo como um todo (BARRIT *et al*, 1999).

A dispersão das mitocôndrias a partir do córtex para o interior do oócito é uma das principais características de maturação citoplasmática. Isso ocorre *in vivo* após o pico de LH.

O movimento das mitocôndrias para áreas de alta demanda de energia é extremamente importante uma vez que são responsáveis pelo fornecimento da energia que é consumida durante o processo de maturação (FERREIRA *et al*, 2009).

Torner e colaboradores, 2003 mostraram que a atividade mitocondrial está associada à sua distribuição, à progressão da meiose e expansão das células do *cumulus*, no entanto o presente trabalho demonstrou algumas diferenças, já que foi observado com meiose bloqueada, o padrão intermediário (C24) ou maduro (B24) de distribuição mitocondrial e em ambos os casos células do *cumulus* compactas. Esse padrão de distribuição mitocondrial mais adiantado sugere um avanço na maturação citoplasmática dos CCOs cultivados em meio definido.

Além dessa migração das mitocôndrias, outra característica citoplasmática de relevância é o alinhamento dos grânulos corticais à membrana plasmática, que no oócito imaturo estão distribuídos em grumos por todo o citoplasma. O movimento estratégico de grânulos corticais no fim do período de maturação é importante para evitar a polispermia, uma vez que a liberação do seu conteúdo após a ativação do oócito promove uma modificação na matriz extracelular impedindo a entrada de novos espermatozóides (FERREIRA *et al*, 2009).

Os resultados apresentados aqui mostram que os grupos C48, B24 e B48 proporcionam o alinhamento dos GC, como no controle maduro, ou o início desse processo em C24. O mesmo foi observado por Fouladi-Nashta *et al* (2006), onde o cultivo de folículos intactos na presença de insulina resultou em oócitos com o núcleo imaturo, porém com características citoplasmáticas de maturação como o a distribuição periférica dos GC.

Insulina, bem como transferrina e selênio que também estão presentes em MIV-C, (os dois últimos itens também presentes em MIV-B) melhoraram a maturação citoplasmática e a competência para o desenvolvimento de embriões quando foram adicionados ao meio de MIV (JEONG *et al*, 2008).

Outro fator que afeta a competência do oócito e sua maturação é o IGF-I. Ele estimula a retomada da meiose em oócitos de porcas e de coelhas (SIROTKIN *et al*, 2000; YOSHIMURA *et al*, 1996). Em éguas, a adição de IGF-I no meio de MIV não aumentou a taxa de oócitos em MII, mas exerceu um efeito positivo na maturação citoplasmática (CARNEIRO *et al*, 2001). Além disso, o IGF-I tem um papel regulador na função ovariana, ovulação, maturação citoplasmática do oócito, bem como na produção de esteroides (LI *et al*, 2004), além de sua ação como um fator de

anti-apoptótico durante a maturação oocitária (WASIELAK, *et al.*, 2007). No presente estudo, MIV-C foi suplementado com uma concentração fisiológica do IGF-I e modificações ultraestruturais relacionadas à maturação citoplasmática, foram observadas nos CCOs cultivados nesse meio.

No entanto, uma vez que os CCOs cultivados em MIV-B, o qual não foi suplementado com hormônios, nem fatores de crescimento, também apresentaram um adiantamento no rearranjo de organelas, o que indicaria um padrão de maturação citoplasmática mais evoluído em relação ao controle imaturo, nota-se que o responsável por tal evento não foi a suplementação presente em MIV-C.

A sugestão, novamente, é que MIV-B foi capaz de manter a integridade fisiológica das células do cumulus como se ainda fossem de um folículo em crescimento. Assim, a progressão da maturação citoplasmática no que diz respeito ao rearranjo das organelas aconteceu até certo ponto, porém não foi finalizada, ou seja, não apresentou um padrão totalmente maduro porque não houve o pico de LH. O que corrobora com essa argumentação é o fato de que o grupo T3 do artigo publicado, ter apresentado ao final das 24h adicionais de cultivo em TCM-199+SFB (“pico de LH”) todas as características de maturidade, exceto pelo desenvolvimento do PvS (Anexo B - Table 1).

A presença de microvilosidades eretas e um espaço perivitelínico desenvolvido também contribuem para evitar a entrada de mais de um espermatozóide no oócito e assim formação de um indivíduo poliplóide e inviável. As microvilosidades eretas foram observadas em pelo menos 50% dos CCOs cultivados em meio definido.

### **6.2.2. Expressão de genes de interesse**

Os resultados da quantificação da expressão dos genes relacionados ao estresse (HSP70.1 e PRDX1) revelaram que no cultivo com MIV-C, os oócitos imaturos apresentaram maior abundância relativa que os oócitos maduros, sendo que a quantificação dos oócitos maduros (com CP) foi igual ao controle maduro e a quantificação dos oócitos imaturos (sem corpúsculo) foi semelhante ao controle imaturo, exceto no grupo C48SCP para o gene PRDX1, o qual se apresentou semelhante ao controle maduro.

No cultivo com MIV-B o resultado da quantificação dos dois genes seguiu padrões semelhantes. Também foi observada maior abundância relativa dos oócitos imaturos em relação aos maduros. No entanto, nesse caso o grupo B24CP (maduro) apresentou maior abundância relativa que o controle maduro.

Embora as proteínas de choque térmico tenham sido descobertas como produtos de genes cuja expressão é induzida pelo calor e outros tipos de estresse, atualmente novas funções para essas proteínas têm sido demonstradas inclusive em células não estressadas (FEDER & HOFMANN 1999).

Análises utilizando a microscopia confocal para localizar a proteína hsp70 em oócitos e embriões revelaram que a distribuição de hsp70 no ooplasma de oócitos imaturos e maduros está intimamente relacionada com o fuso meiótico, indicando o seu possível papel na estabilização desta estrutura (KAWARSKI & KING, 2001).

Lanska *et al* (2006) mostrou que oócitos em crescimento sintetizam HSP70 sob condições fisiológicas sem que esses passem por estresse, o que suporta a hipótese de que HSP70 é importante para o crescimento e maturação. Outro estudo sugere que essa síntese pode estar relacionada à alta atividade transcricional e à necessidade de proteção a proteínas recém sintetizadas (HYTTEL *et al*, 2001).

Oócitos de camundongos no estágio de vesícula germinativa apresentam uma maior concentração de proteínas hsp70 do que oócitos em metáfase II e embriões antes da implantação. Estudos demonstram que após a maturação os oócitos de bovinos perdem a capacidade de sintetizar essas proteínas mesmo passando pelo estresse térmico (EDWARDS & HANSEN, 1996), nesses caso só ocorre a depleção do estoque acumulado antes da maturação.

Outro estudo diz que oócitos em crescimento são capazes de sintetizar HSP70 após o estresse, mas que essa capacidade é perdida com o fim do crescimento oocitário (LANSKA *et al*, 2006). Isso porque após o crescimento oocitário e início da meiose, os oócitos se tornam transcionalmente inativos (SCHULTZ & HEYNER, 1992).

As peroxiredoxinas (PRDXs) formam uma família de enzimas antioxidantes que é composta por seis membros, PRDX1 a PRDX6 (LEYENS *et al.*, 2003). As PRDXs são proteínas implicadas não só na defesa antioxidante, mas também na proliferação celular, diferenciação, resposta imune e controle da apoptose (RHEE *et al*, 2001).

É bem sabido que o metabolismo aeróbio por si só leva à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Além disso, as técnicas de PIVE também expõem oócitos e embriões, a condições que estimulam a produção de ROS, como o nível de oxigênio atmosférico (20% de oxigênio em vez de cerca de 7% no oviduto), luz visível e traços de metais pesados nos meios de cultura. Todos esses fatores são responsáveis por uma maior geração de ROS que podem prejudicar a produção de embriões *in vitro* (GUERIN *et al.*, 2001).



De acordo com Pereira *et al.*, (2010), oócitos maturados em meio contendo PVA em substituição ao soro, e na presença de 20% de oxigênio exibiram níveis de transcritos relacionados ao estresse oxidativo (HSP 70.1 e PRDX1) elevados com o objetivo de minimizar o estresse ocasionado pelas condições de cultivo. Outro efeito observado na maturação do oócitos com PVA e 20% de oxigênio foi um aumento no índice de apoptose dos blastocistos comparado com blastocistos provindos de oócitos amadurecidos na presença de 5% de oxigênio ou soro.

Os resultados apresentados aqui, após o cultivo em MIV-C mostraram que o cultivo nesse meio, na presença de 20% de oxigênio e possuindo PVA em sua constituição, não promoveu estresse adicional aos oócitos, uma vez que a quantificação do gene PRDX1 não se apresentou elevada em relação aos controles.

Após o cultivo com MIV-B, no entanto, embora não tenham sido observados valores superiores em relação ao do controle imaturo, o grupo B24CP (maduro) apresentou maior abundância relativa para esse gene (PRDX1) do que o controle maduro, podendo sugerir a intenção de minimizar algum estresse promovido pelo cultivo.

Com relação ao gene GDF9, o cultivo dos CCOs por 24h em MIV-C promoveu maior abundância relativa tanto no grupo maduro (C24CP), quanto no imaturo (C24SCP), quando comparados ao controle maduro (T24CP). No entanto, a quantificação não foi maior do que a vista no controle imaturo. Já nas 24h subsequentes de cultivo em MIV-C, a quantificação desse gene foi semelhante ao do controle maduro.

No cultivo com MIV-B, todos os grupos apresentaram menor abundância relativa do que o controle imaturo e maior quantificação em relação ao controle maduro.

Em um estudo que analisou a expressão de GDF-9 durante a maturação de oócitos de porcas, foi observado que esse gene se mostrou altamente expresso em oócitos imaturos, no entanto essa expressão foi diminuindo com o processo de maturação (LI *et al.*, 2008), o que corrobora com os resultados encontrados aqui. Pennetier *et al.*, (2004) demonstrou que em bovinos a expressão de GDF9 é contínua desde oócitos imaturos, até o estágio embrionário de 8 células, passando pela MIV, e sugere seu papel importante nesses processos. A maior abundância relativa de GDF9 em oócitos maduros cultivados por 24h em MIV-C, ou MIV-B, comparado ao controle maduro pode ser indicativo de uma melhor qualidade do oócito uma vez que esse é um fator relacionado à competência.

Este fator de crescimento também induz a expansão das células do cumulus por permitir-las responder ao FSH e assim produzirem ácido hialurônico (Eppig, 2001). No entanto, devido à

ausência de FSH, ou soro nos meios propostos (MIV-B e MIV-C), a expansão das células do cumulus não foi observada.

A abundância relativa do gene IGFIR não apresentou diferença significativa após o cultivo por 24 ou 48h em MIV-C em relação aos controles imaturo e maduro. No entanto, na comparação da quantificação desse gene após o cultivo em MIV-B por 24h em relação aos mesmos controles, foi observado que o controle maduro apresentou menor abundância relativa do que os demais grupos.

Wasielak e Bogacki (2007) sugeriram que a quantidade de IGF-I produzido pelas células do cumulus durante o cultivo *in vitro* era insuficiente para a maturação, e, portanto, eles concluíram que sua suplementação seria necessária para a maturação.

Com o presente resultado, sugere-se que devido ao fato de MIV-B não possuir IGF-I em sua composição, aconteceu uma “up regulation” dos receptores de IGF-I com o intuito de aumentar a capacidade de captação desse fator de crescimento no meio, o que também corrobora com a conclusão citada acima.

A maioria dos casos acima descritos, a maior abundância relativa em oócitos imaturos pode ser atribuída ao fato de que quando os oócitos amadurecem, ou seja, retomam a meiose, eles têm a cromatina condensada e conseqüentemente ocorre uma diminuição na transcrição.

## 7. CONCLUSÃO

A inibição da meiose obtida no cultivo dos CCOs em MIV-C não foi revertida após as 24h adicionais de cultivo no próprio MIV-C. No entanto, o sistema de cultivo que proporcionou a inibição da meiose dos CCOs cultivados em MIV-C por 24h e seu posterior desbloqueio obtido após cultivo adicional em TCM-199+SFB por mais 24h, segue os padrões observados *in vivo* de um folículo em crescimento.

Em relação à maturação citoplasmática, no que diz respeito ao rearranjo de organelas, após cultivo dos CCOs em MIV-C por 24h foram observadas características intermediárias entre um citoplasma considerado maduro e outro considerado imaturo. Às 48h de cultivo em MIV-C, embora a meiose (núcleo) continuasse bloqueada, alguns avanços foram observados na maturação citoplasmática, como a presença de mitocôndrias dispersas pelo citoplasma e GC alinhados à membrana como no controle maduro.

O cultivo em MIV-B, o qual não possui hormônios e fatores de crescimento em sua constituição, também foi capaz de bloquear a meiose e mostrar características de um avanço na maturação citoplasmática no que diz respeito ao rearranjo de organelas citoplasmáticas após 24h de cultivo. O desbloqueio parcial da meiose (em 50% dos CCOs) foi alcançado com 32h de cultivo nesse mesmo meio.

A quantificação de genes relacionados ao estresse e à competência de forma geral mostrou que os sistemas de cultivo propostos são adequados e que os CCOs cultivados nesses sistemas se comportam de maneira semelhante aos controles, onde oócitos maduros se assemelham ao controle maduro e oócitos imaturos se assemelham ao controle imaturo.

Concluiu-se ainda que o cultivo de CCOs em MIV-B ou MIV-C, por se tratar de dois meios estritamente definidos e que, portanto permitem a obtenção de respostas consistentes, constituem bons modelos para o estudo dos eventos que ocorrem durante a maturação oocitária sem necessidade do uso de inibidores da meiose. A manutenção dos CCOs em estágio imaturo *in*

*vitro* sem qualquer efeito prejudicial pode ser usada para fornecer tempo adicional para estudar o processo de sincronização entre a maturação citoplasmática e nuclear durante a MIV.

## 8. REFERÊNCIAS

ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. **Biol Reprod**, 58:1316–20, 1998.

ADONA, P.R.; PIRES, P.R.L.; QUETGLAS, M.D.; LEAL, C.L.V. Nuclear maturation kinetics and *in vitro* embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitine. **Animal Reproduction Science**, doi:10.1016/j.anireprosci.2007.06.013, 2007a.

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

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

ALI, A.; SIRARD, M.A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Biol Reprod**, 66:901–5, 2002.

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

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

AVERY, B.; HAY- SCHMIDT, A.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Embryo development, oocyte morphology, and kinetics of meiotic maturation in bovine oocytes exposed to 6-DMAP prior to *in vitro* maturation. **Molecular Reproduction and Development**, 50: 334-344, 1998.

AYOUB, M.A.; HUNTER, A.G. Inhibitory effect of bovine follicular fluid on *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Journal of Dairy Science**, 76: 95–100, 1993.

BARRIT, J.A.; BRENNER, C. A.; COHEN, J.; MATT, D.W. Mitochondrial DNA rearrangements in human oocytes and embryos. **Molecular Human Reproduction**, 5:927-933, 1999.

BLANCO, M.R.; DEMYDA, S.; MORENO MILLÁN, M.; GENERO, E. Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: a review. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, 6: 155-165, 2011.

BETTEGOWDA, A.; PATEL, O. V.; IRELAND, J. J.; SMITH, G. W. Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, beta-glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, beta-actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis in vitro. **Mol Reprod Dev**, 73: 267-278, 2006.

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

BLONDIN P, SIRARD MA. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Mol Reprod Dev**, 41:54–62, 1995.

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

CAMPBELL, B. K. Inhibin oestradiol and progesterone production by ovine granulosa cells *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series 3 Abstract 37**, 1989.

CAMPBELL, B. K.; SCARAMUZZI, R. J.; WEBB, R. Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. **Journal of Reproduction and Fertility**, 106:7-16, 1996.

CARNEIRO, G.; LORENZO, P.; PIMENTEL, C.; PEGORARO, L.; BERTOLINI, M.; BALL, B.; ANDERSON, G.; LIU, I. Influence of insulin-like growth factor-I and its interactions with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on *in vitro* maturation and parthenogenic development in equine oocytes. **Biol Reprod**, 65:899–905, 2001.

CHANDOLIA, R.K.; PELTIER, M.R.; TIAN, W.; HANSEN, P.J. Transcriptional control of development, protein synthesis, and heat-induced heat shock protein 70 synthesis in 2-cell bovine embryos. **Biology of Reproduction**, 61:1644–8, 1999.

CHERYL, L.A.; GITTENS, J.E.I.; O'BRIEN, M.J.; EPPIG, J.J.; KIDDER, G.M. Intercellular communication via connexin 43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. **Developmental Biology**, 233: 258-270, 2001.

CHIAN, RI-CHENG.; BUCKETT, W. M.; TAN, SEANG-LIN. In vitro maturation of human oocytes. **Reproductive Biomedicine on line**, 8: 148-166, 2003.

COLLARES, C.V.A. ; ROSA E SILVA, A. A. M. . Granulosa cells culture in chemically defined medium: Is there mimicry between those cells and the cells of dominant follicle and/or preovulatory follicle. **Biology of Reproduction**, 68: 319-320, 2003.

COLEMAN, N.V.; SHAGIAKHMETOVA, G.A.; LEBEDEVA, I.Y.; KUZMINA, T.I.; GOLUBEV, A.K. In vitro maturation and early developmental capacity of bovine oocytes cultured in pure follicular fluid and supplementation with follicular wall. **Theriogenology**, 67: 1053-1059, 2007.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DOHERTY, A.S.; MANN, M.N.; TREMBLAY, K.D. *et al.* Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. **Biology of Reproduction**, 62: 1526-1535, 2000.

DOSTAL, J.; PAVLOK, A. Isolation and characterization of maturation inhibiting compound in bovine follicular fluid. **Reproduction Nutrition Development**, 36 :681–690, 1996.

DOWNS, S.M. The influence of glucose, cumulus cells, and metabolic coupling on ATP levels and meiotic control in the isolated mouse oocyte. **Developmental Biology**, 167: 502-512, 1995.

DOWNS, S.M.; DANIEL, S.A.J.; BORNSLAEGER, E.A.; HOPPE, P.C.; EPPIG, J.J. Maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes by purines: modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity. **Gamete Research**, 23: 323–334, 1989.

DOWNS, S.M.; DOW, M.P.; FAGBOHUN, C.F. The meiotic response of cumulus cell-enclosed mouse oocytes to follicle-stimulating hormone in the presence of different macromolecules. **J Exp Zool**, 258:373–83, 1991.

DOWNS, S.M.; HUNZICKER-DUNN, M. Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte cumulus cell complex by site selective analogs of cyclic adenosine monophosphate. **Developmental Biology**, 172:72-85, 1995.

DUMOLLARD, R.; DUCHEN, M.; CARROLL, J. The Role of Mitochondrial Function in the Oocyte and Embryo. **Current Topics in Developmental Biology**, 77:21-49, 2007.

DUMOLLARD, R.; DUCHEN, M.; SARDET, C. Calcium signals and mitochondria at fertilisation. *Semin. Cell Dev. Biol*, 17: 314–324, 2006.

DURINZI, K.L.; SANIGA, E.M.; LANZENDORF, S.E. The relationship between size and maturation in vitro in the unstimulated human oocyte. **Fertility and Sterility**, 63: 404-406, 1995.

EDWARDS, J.L.; HANSEN, P.J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. **Biology of Reproduction**, 55, 340–346, 1996.

EDWARDS, J.L.; KING, W.A.; KAWARSKY, S.J.; EALY, A.D. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of Hsp-70 and Glutathione. **Theriogenology**, 55:209-23, 2001.

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

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

FAIR, T.; HULSHOF, S.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, 46: 208-215, 1997.

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

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

FARIN, C.E. ; YANG, L. Inhibition of germinal vesicle breakdown in bovine oocytes by DRB. **Molecular Reproduction and Development**, 37: 284-292, 1994.



FEDER, M.E.; HOFMANN, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Reviews of Physiology**, 61: 243-282, 1999.

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, 71:836-48, 2009.

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

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

FOULADI-NASHTA, A.A.; CAMPBELL, K.H.S. Dissociation of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation by the addition of insulin in cultured bovine antral follicles. **Reproduction**, 131:449-60, 2006.

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

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

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

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

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

GARDNER, D.K.; LANE, M. Alleviation of the 2 cell block and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of aminoacids, EDTA and physical parameters. **Human Reproduction**, 11: 2701-2712, 1996.

GARDNER, D.K.; WEISSMAN, A.; HOWLES, C.M.; SHOAM, Z. Textbook of assisted reproductive techniques. Fourth Edition, 421p, 2012.

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

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

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

GODE, F.; BULENT GULEKLI; ERBIL DOGAN; PEYDA KORHAN; SEDA DOGAN; OZGUR BIGE; DILEK CIMRIN; NESE ATABEY. Influence of follicular fluid GDF9 and BMP15 on embryo quality. **Fertility and Sterility**, doi:10.1016/j.fertnstert.2011.03.045, 2011.

GORDO, A.C.; HE, C.L.; SMITH, S.; FISSORE, R. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, 59: 106-114, 2001.

GUERIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Hum Reprod Update**, 7:175-189, 2001.

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

HAMMON, D.S.; WANG, S.; HOLYOAK, G.R. Ammonia concentration in bovine follicular fluid and its effect during in vitro maturation on subsequent embryo development. **Animal Reproduction Science**, 58: 1-8, 2000a.

HAMMON, D.S.; WANG, S.; HOLYOAK, G.R. Effects of ammonia during different stages of culture on development of in vitro produced bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, 59: 23-30, 2000b.

HARTL, F.U.; HAYER-HAR, T.L.M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science**, 295:1852-8, 2002.

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

HIRAO, Y.; ITOH, T.; SHIMIZU, M.; IGA, K.; AOYAGI, K.; KOBAYASHI, M, et al. In vitro growth and development of bovine oocyte-granulosa cell complexes on the flat substratum: effects of high polyvinylpyrrolidone concentration in culture medium. **Biol Reprod**, 70:83-91, 2004.

HO, Y.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J.J.; SCHULTZ, R.M. Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by aminoacids and analysis of gene expression. **Molecular Reproduction Development**, 41: 232-238, 1995.

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

HYTTEL, P.; VIUFF, D.; FAIR, T.; LAURINCIK, J.; THOMSEN, P.D.; CALLESEN, H.; VOS, P.L.A.M.; HENDRIKSEN, P.J.M.; DIELEMAN, S.J.; SCHELLANDER, K.; BESENFELDER, U.; GREVE, T. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Reproduction**, 122: 21–30, 2001.

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

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

JANSEN RP, DE BOER K. The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. **Mol Cell Endocrinol**, 145: 81–88, 1998.

JEONG, Y.W.; HOSSEIN, M.S.; BHANDARI DILIP, P.; KIM, Y.W.; KIM, J.H.; PARK, S.W.; EUGINE, L.; PARK, S.M.; JEONG, Y.I.; LEE, J.Y.; SUE, K.; HWANG, W.S. Effects of insulin–transferrin–selenium in defined and porcine follicular fluid supplemented IVM media on porcine IVF and SCNT embryo production. **Animal Reproduction Science**, 106:13–24, 2008.

JOSEFSBERG, L.B.; GALIANI, D.; DANTES, A.; AMSTERDAM, A.; DEKEL, N. The proteosome is involved in the first metaphase to anaphase transition of meiosis in rat oocytes. **Biology of Reproduction**, 62:1270-1277,2000.

JOSEFSBERG, L.B.; GALIANI, D.; LAZAR, S.; KAUFMAN, O.; SEGER, R.; DEKEL, N. MPF governs MAPK activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. **Biology of Reproduction**, 68:1282-1290, 2003.

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

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

KALOUS, J.; SUTOVSKY,P.; RIMKEVICOVA, Z.; SHIOYA, Y.; LIE, B.L.; MOTLIK, J. Pig me,brana-granulosa cells prevent resumption of meiosis in cattle oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, 34: 58-64, 1993.

KASTROP, P.M.; HULSHOF, S.C.J.; BEVERS, M.M.; DESTREE, O.H.J.; KRUIP, T.A.M. The effects of  $\alpha$ -amanitin and cycloheximide on nuclear progression, protein synthesis, and phosphorylation during bovine oocyte maturation in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, 28:249-254, 1991b.

KAWARSKY, S.J.; KING, W.A. Expression and localization of heat shock protein 70 in cultured bovine oocytes and embryos. **Zygote**, 9: 39-50, 2001.

KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. **Biol Reprod**, 55:333-9, 1996.

KIDDER, G.M. The genetic program of preimplantation development. **Dev Genet**, 13: 319-325, 1992.

KRUIP, T.; CRAN, D.; VAN BENEDEN, T.; DIELEMAN, S. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vitro. **Gamete Research**, 8: 29-47, 1983.

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

KURAN, M.; ROBINSON, J.J.; BROWN, D.S.; MCEVOY, T.G. Development, amino acid utilization and cell allocation in bovine embryos after in vitro production in contrasting culture systems. **Reproduction**, 124: 155-165, 2002.

LANE, M.; GARDNER, D.K. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. **Human Reproduction**, 13: 991-997, 1998.

LANGHOUT, D. J.; SPICER, L. J. AND GEISERT, R. D. Development of a culture system for bovine granulosa cells: effects of growth hormone, estradiol and gonadotrophins on cell proliferation steroidogenesis and protein synthesis. **Journal of Animal Science**, 69: 3321-3334, 1991.

LANSKA, V.; CHMEL'IKOV'A, E.; SEDM'IKOV'A, M.; PETR, J.; RAJMON, R.; JE`SETA, M.; ROZINEK, J. Expression of heat shock protein70 in pig oocytes: Heat shock response during oocyte growth. **Animal Reproduction Science**, 96 : 154-164, 2006.

LANUZA, G.M.; FICHIMAN, M.L.; BARAÑAO, J.L. Growth promoting activity oocytes on granulosa cells is decreased upon meiotic maturation. **Developmental Biology**, 197: 129-139, 1998.

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

LENZ, R.W.; BALL, G.D.; LEIBFRIED, M.L.; AX, R.L.; FIRST, N.L. In vitro maturation and fertilization of bovine oocyte are temperature dependent processes. **Biol. Reprod.** 29, 173-179, 1983.

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

LEYENS, G.; DONNAY, I.; KNOOPS, B. Cloning of bovine peroxiredoxins: Gene expression in bovine tissues and amino acid sequence comparison with rat, mouse, and primate peroxiredoxins. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, 136: 943–955, 2003.

LEYENS, G.; KNOOPS, B.; DONNAY, I. Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Mol Reprod Dev**, 69: 243-251, 2004.

LI, X.; DAI, Y.; ALLEN, W.R. Influence of insulin-like growth factor-I on cytoplasmic maturation of horse oocytes in vitro and organization of the first cell cycle following nuclear transfer and parthenogenesis. **Biol Reprod**, 71:1391–6, 2004.

LI, H.K.; KUO, T.Y.; YANG, H.S.; CHEN, L.R.; LI, S.S.L.; HUANG, H.W. Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 during *in vitro* maturation of porcine oocytes and early embryos. **Animal Reproduction Science**, 103: 312–322, 2008.

LIM, J.M.; LEE, B.C.; CHUNG, H.M.; KO, J.J.; PARK, S.E.; CHA, K.Y.; HWANG, W.S. In vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes cultured in a chemically defined, protein-free medium: effects of carbohydrates and amino acids. **Reproduction, Fertility and Development**, 11 :127–132, 1999.

LINDENBAUM, A. Survey of naturally occurring chelating ligands. **Advances in Medical Biology**, 40: 67–77, 1973.

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

LONERGAN, P.; FAIR, T.; GORDON, I. Effect of time of transfer to granulosa cell monolayer and cell-stage at 48 h post-insemination on bovine oocyte development following IVM/IVF/IVC. **Proc 8th Conf Eur Embryo Trans Assoc, Lyon**, p. 78, 1992.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; CAROLAN, C.; MERMILLOD, P. Bovine blastocyst production in vitro after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. **J Reprod Fertil**, 109:355–65, 1997.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D. *et al.* Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, 37: 48-53, 1994.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reprod Domest Anim**, 38: 259–67, 2003.

LUCY MC. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. **J Dairy Sci**, 83:1635–47, 2000.

MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOSEKOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, 61: 329-335, 2004.

MARTUS, N.S.; FARIN, C.E. Effectiveness of DRB for inhibiting germinal vesicle breakdown in bovine oocytes. **Theriogenology**, 42: 1295-1302, 1994.

Mc KIERNAN, S.H.; BAVISTER, B.D. Different lots of bovine serum albumin inhibit or stimulate in vitro development of hamster embryos. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, 28 A: 154-156, 1992.

MEIJER, L. Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. **Cell Biology**, 6: 393-397, 1996.

MEINECKE, B.; MEINECKE-TILLMAN, S. Effects of alpha-amanitin on nuclear maturation of porcine oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, 98: 195-201, 1993.

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

MIZUSHIMA, S.; FUKUI, Y. Fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined maturation medium. **Theriogenology**, 55:1431– 45, 2001.

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

MONAGHAN, P.C.C.; LONERGAN, P.; SHARIF, H.; WAHID, H.; GORDON, I. The effect of maturation time on the subsequent in vitro development of bovine oocytes. **Theriogenology**, 39:370, 1993. [abstract].

MONTREZOR, L.H.; PICCINATO, C.A.; ROSA E SILVA, A.A.M. Polyvinyl alcohol is effective in a defined media long-term bovine granulosa cell culture in the maintaince of 17 beta-estradiol production. **SSR Society for the Study of Reproduction**, Annual Meeting, Baltimore, 28–31, 2002. [abstract].

MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; SIRARD, M. A. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Mol Reprod Dev**, 73: 1367-1379, 2006.

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

NEUER, A.; SPANDORFER, S.D.; GIRALDO, P. Heat shock protein expression during gametogenesis and embryogenesis. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 7: 10–16, 1999.

NEUMANN, C. A.; KRAUSE, D. S.; CARMAN, C. V.; DAS, S.; DUBEY, D. P.; ABRAHAM, J. L.; BRONSON, R. T.; FUJIWARA, Y.; ORKIN, S. H.; VAN ETTEN, R. A. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defense and tumour suppression. **Nature**, 424: 561-565, 2003.

NOGUEIRA , D.; ALBANO,C.; ADRIAENSES, 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**, 69: 1042-1052, 2003.

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 cultura definido. Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2008, 84 p. Dissertação de Mestrado.

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

ORISAKA, M.; ORISAKA, S.; JIANG, J.Y.; CRAIG, J.; WANG, Y.; KOTSUJI, F. *et al.* Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. **Mol Endocrinol**, 20: 2456–68, 2006.

ORSI, N.M .; LEESE, H.J. Ammonium exposure and pyruvate affect the amino acid metabolism of bovine blastocysts. **Reproduction**, 127: 131–140, 2004.

PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, 66:1169–77, 2002.

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

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

PENNETIER, S. ;UZBEKOVA, S.; PERREAU, C.; PAPILLIER, P.; MERMILLOD, P.; DALBIES-TRAN, R. Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos. **Biol. Reprod.** 71, 1359–1366, 2004.

PFÄFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, 29(9):e45, 2001.

PEREIRA, M.M.; MACHADO, M.A.; COSTA, F.Q.; SERAPIAO, R.V.; VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. Effect of oxygen tension and serum during IVM on developmental competence of 483 bovine oocytes. **Reprod Fertil Dev**, 22: 1074-1082, 2010.

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

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

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

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

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

RHEE, S.G.; KANG, S.W.; CHANG, T.S.; JEONG,W.; KIM, K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. **IUBMB Life** 52:35–41, 2001.

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

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

RIEGER, D.; LOSKUTOFF, N.M . Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, 100: 257–262, 1994.

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

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

ROSA e SILVA A.A.M.; OLIVEIRA e SILVA I.; VASCONCELOS, R.B.; GULART, L.V.M.; ROSA e SILVA, L.G. Meios de cultura para maturação de oócitos de mamíferos, processo de obtenção dos mesmos e processos de inibição-reversão da maturação nuclear e aceleração da maturação citoplasmática e suas aplicações para a produção de embrião *in vitro*. Patente PI número 0803140-1, data do depósito 12/05/2008, por: Fundação Universidade de Brasília.

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

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

SAGIRKAYA, H.; MISIRLIOGLU, M.; KAYA, A.; FIRST, N.; PARRISH, J.; MEMILI, E. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. **Anim Reprod Sci**, 101, 225-240, 2007.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1833:1896-1912, 2012.



SCHULTZ, G.A.; HEYNER, S. Gene expression in preimplantation mammalian embryos. **Mutat. Res**, 296: 17–31, 1992.

SHIBUYA, E.K.; MASUI, Y. Molecular characteristics of cytotostatic factors in amphibian egg cytosols. *Development*, 106: 799-808, 1989.

SHIMIZU, T.; MIYAHAYASHI, Y.; YOKOO, M.; HOSHINO, Y.; SASADA, H.; SATO, E. Molecular cloning of porcine growth differentiation factor 9 (GDF-9) cDNA and its role in early folliculogenesis: direct ovarian injection of GDF-9 gene fragments promotes early folliculogenesis. **Reproduction**, 128: 537–543, 2004.

SIMILI, M.; PELLERANO, P.; PIGULLO, S.; TAVOSANIS, G.; OTTAGIO, L.; SAINT-GEORGES, L.; *et al.* 6-DMAP inhibition of early cell cycle events and induction of mitotic abnormalities. **Mutagenesis**, 12: 313-319, 1997.

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

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

SIRARD, M.A.; COENEN, K.; BILODEAU, S. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**, 37: 39-55, 1992.

SIRARD, M.A.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**, 68: 71–76, 2007.

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

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

SIRARD MA, RICHARD F, MAYES M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**; 49:483–97, 1998.

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

SIROTKIN, A.V.; DUKESOVÁ, J.; MAKAREVICH, A.V.; KUBEK, A.; BULLA, J. Evidence that growth factors IGF-I, IGF-II and EGF can stimulate nuclear maturation of porcine oocytes via intracellular protein kinase A. **Reproduction and Nutrition**, 40:559–69, 2000.

SIROTKIN, A.V.; TARADAJNIK, T.E.; MAKAREVICH, A.V.; BULLA, J. Effect of follicular cells, IGF-I and tyrosine kinase blockers on oocyte maturation. **Animal Reproduction Science**, 51: 333-344, 1998.

SKINNER, M.K.; OSTEEN, K.G. Developmental and hormonal regulation of bovine granulosa cell function in the preovulatory follicle. **Endocrinology**, 123:1668-1675, 1988.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONCALVES, P.B. et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biol Reprod**, 64:904–9, 2001.

TAANMAN, J.W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. **Biochim Biophys Acta** 1, 410:103– 123, 1999.

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

TATEMOTO, H.; TERADA, T. Time-dependent effects of cycloheximide and  $\alpha$ -amanitin on meiotic resumption and progression in bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, 43:1107-1113,1995.

TORNER, H.; BRUSSOW, K.P.; ALM, H.; RATKY, J.; POHLAND,R.; TUCHSCHERER, A.; KANITZ, W. Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. **Theriogenology**, 61: 1675-1689, 2004.

TRIMARCHI, J., LIU, L., PORTERFIELD, D., SMITH, P., AND KEEFE, D. Oxidative phosphorylation - dependent and - independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. **Biol. Reprod**, 62: 1866–1874, 2000.

TSAFRIRI, A.; CHANNING,C.P. Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, 43: 149-152, 1975.

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

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

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

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

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

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

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

VIREQUE, A.A.; CAMARGO, L.S.A.; SERAPIÃO, R.V.; ROSA E SILVA, A.A.M.; WATANABE, Y.F.; FERREIRA, E.M.; NAVARRO, P.A.A.S.; MARTINS, W.P.; FERRIANI, R.A. Preimplantation development and expression of Hsp-70 and Bax genes in bovine blastocysts derived from oocytes matured in alpha-MEM supplemented with growth factors and synthetic macromolecules. **Theriogenology**, 71: 620 -7, 2009.

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

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

WASIELAK M.; BOGACKI, M. Apoptosis inhibition by insulin-like growth factor (IGF)-I during in vitro maturation of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, 53: 419 -26, 2007.

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

WATSON, A.J.; DE SOUSA, P.; CAVENEY, A.; BARCROFT, L.C.; NATALE, D.; URQUHART, J.; et al. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biology of Reproduction**, 62:355- 64, 2000.

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

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

WELCH, W.J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins and implications for medicine and disease. **Physiol Rev**, 72:1063-81, 1992.

WRENZYCKI, C.; HERRMAN, D.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. **Mol Reprod Dev**, 53: 8-18, 1999.

WRENZYCKI, C.; HERRMAN, D.; LUCAS-HAHN, A.; KORSAWE, K.; LEMME, E.; NIEMANN, H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. **Reprod Fertil Dev**, 17: 23-35, 2005.

WRENZYCKI, C.; HERRMAN, D.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**, 68S: S77-S83, 2007.

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

YOSHIMURA, Y.; ANDO, M.; NAGAMATSU, S.; IWASHITA, M.; ADACHI, T.; SUEOKA, K.; MIYAZAKI, T.; KUJI, N.; TANAKA M. Effects of insulinlike growth factor on follicle growth, oocyte maturation and ovarian steroidogenesis and plasminogen activator in the rabbit. **Biology of Reproduction**, 55:152– 60, 1996.

ZHANG, L.; JIANG, S.; WOZNIAK, P.J.; YANG, X.; GODKE, R.A. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization and embryo development *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, 40: 338-344, 1995.

## ANEXOS

## Anexo A. Artigo Publicado na Theriogenology.

ARTICLE IN PRESS



Available online at www.sciencedirect.com



Theriogenology

Theriogenology xx (2010) xxx

www.theriojournal.com

## Induction of reversible meiosis arrest of bovine oocytes using a two-step procedure under defined and nondefined conditions

I. Oliveira e Silva<sup>a</sup>, R.B. Vasconcelos<sup>a</sup>, J.V.O. Caetano<sup>b</sup>, L.V.M. Gulart<sup>a</sup>,  
L.S.A. Camargo<sup>c</sup>, S.N. Bão<sup>b</sup>, A.A.M. Rosa e Silva<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory for the Study of Reproduction, Biological Institute, University of Brasília, DF, 70910-900, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Cell Biology, Biological Institute, University of Brasília, DF, 70910-900, Brazil

<sup>c</sup> Embrapa Dairy Cattle (CNPGL), Juiz de Fora, MG, 36038-330, Brazil

Received 7 December 2009; received in revised form 7 November 2010; accepted 9 November 2010

### Abstract

The objective was to study the effect of a defined culture system, on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes, using the two-step procedure of IVM to detect possible inhibition and subsequent resumption of meiosis arrest. In the first step, called the prematuration period (PMP), COCs were cultured in T1—non-defined medium (NDM), or T2—defined medium (DM), both for 24 h. In step 2, called the resumption period (RP), COCs were cultured in: NDM (T1); DM + NDM (T3); or DM+DM (T4) for 24 h in each medium. The NDM was composed of TCM-199 supplemented with FCS and FSH. The DM was composed of alpha-MEM supplemented with PVA, insulin, IGF-1, androstenedione, nonessential amino acids, transferrin, and sodium selenium. Oocytes from T2 had a lower ( $P < 0.05$ ) rate of nuclear maturation (19.8%) than T1 oocytes (83.2%). Also, T2 COCs appeared to be in the process of cytoplasmic maturation, according to the distribution of organelles assessed by transmission electron microscopy (MET). These COCs had characteristics previously described as mature: erect microvilli on the plasmemembrane, presence of cortical/evenly distributed mitochondria throughout the ooplasm, and presence of 50% aligned/cluster cortical granules. Immature characteristics such as small PvS, compact cumulus cells, and presence of 50% cortical granule clusters were also observed. The T1 COCs had only characteristics of maturation ( $P < 0.05$ ). In step 2 (RP), meiosis arrest induced by DM was resumed after an additional 24 h of culture in NDM (T3) with 79.2% mature COCs, whereas in T4, meiosis arrest was maintained, resulting in almost 70% immature COCs ( $P < 0.05$ ). At the end of RP, T3 COCs had the mature characteristics of mitochondria spread throughout the cytoplasm ( $P < 0.05$ ), cumulus expansion, and alignment of cortical granules, whereas the T4 group had both immature and mature characteristics. We inferred that DM can be used in lieu of meiosis inhibitors and furthermore, it can provide extra time to study nuclear and cytoplasmic maturation synchrony of IVM.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Bovine; Oocytes; Cytoplasmic maturation; Nuclear maturation; Chemically defined medium

### 1. Introduction

Mammalian oocytes are arrested at the dictyate stage until they have completed their growth. Meiosis is resumed by inducing an *in vivo* preovulatory luteinizing

hormone (LH) surge, or by transferring the oocytes from their surrounding somatic follicle cells into suitable culture conditions [1]. *In vivo* COC maturation occurs when nucleus and cytoplasm are ready to be fertilized and are able to initiate early embryonic development [2]. However, oocytes for *in vitro* maturation (IVM) derived from immature follicles may be competent to reach nuclear maturation but, according to the literature, do not have enough time to undergo all

\* Corresponding author. Tel.: +55 (61) 3107-2914; fax: +55 (61) 3107-2926.

E-mail address: aamresil@unb.com (A.A.M. Rosa e Silva)

## ARTICLE IN PRESS

2

I. Oliveira e Silva et al. / Theriogenology xx (2010) xxx

the necessary changes to acquire a complete competent cytoplasm [3,4]. This lack of synchrony between nuclear and cytoplasmic competence during *in vitro* maturation may explain the limited embryo production obtained with *in vitro* fertilization.

In an effort to solve this asynchrony, many studies have modified the culture conditions of IVM in which oocyte culture takes place in a two-step procedure. In this procedure, a pre-maturation period in which a meiosis inhibitor is added to the culture medium is followed by a maturation period that occurs in the absence of inhibitors. This approach aims to provide extra time for mammalian oocytes to undergo the necessary cytoplasmic changes they require to become fully competent [3,5–8].

It is known that culture conditions and intrinsic quality are determinants for oocyte competence [9]. For instance, serum is added in most culture media for oocyte maturation. However, the addition of serum can induce spontaneous luteinization of follicle cells and increase progesterone concentration in the maturation medium, creating an *in vitro* environment not compatible with the *in vivo* environment found in follicles containing oocytes undergoing maturation [10]. Additionally, serum may contain compounds to which oocytes are not exposed to *in vivo*; these may introduce physiological variability to an IVM system [11]. Thus, serum replacement is important to address the exact effect of any supplement on oocyte maturation or embryo development [12].

Serum replacement by polyvinyl alcohol (PVA) has been shown to be suitable as a chemically defined IVM medium [13]. Polyvinyl alcohol is a synthetic polymer, with a molecular weight of 30,000–70,000, used in cell culture media for stabilization of osmotic pressure and as a surfactant and heavy metal chelating agent [14]. There is evidence that PVA can replace proteins [15] in IVM of bovine oocytes without impairing subsequent development [16–21].

A chemically defined medium (DM) supplemented with PVA but without gonadotrophins, was developed by our team, with the intention to develop a serum-free bovine granulosa cell culture system in which estradiol production could be maintained using PVA, and thus mimic a growing follicle. This approach resulted in a significant increase in estradiol and decrease in progesterone production by the cells cultured in DM, when compared with cells cultured in medium supplemented with BSA [22]. The establishment of culture systems that can mimic the conditions of *in vivo* oocyte matu-

ration can prevent or minimize the interference of culture conditions on oocyte and embryo development.

The objective of this research was to study the effect of this defined culture system on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes using the two-step procedure of oocyte maturation.

## 2. Material and methods

All chemicals used were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), unless stated otherwise.

### 2.1. Recovery of oocytes

Bovine ovaries were obtained from a local abattoir and transported to the laboratory in saline solution containing 100 µg/mL streptomycin sulphate, at 30–35 °C. Follicles 2 to 8 mm in diameter were aspirated with an 18-gauge needle to obtain COCs with a compact cumulus and evenly granulated cytoplasm, as described by Blondin and Sirard [23].

### 2.2. Oocyte culture medium composition

Two culture media were evaluated: a non-defined medium (NDM) and a defined medium (DM). The NDM (control medium) was composed of TCM-199 with Earl's salts (Invitrogen-Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 49.9 µg/mL pyruvic acid, 20 µg/mL FSH, and 50 IU/mL penicillin and streptomycin (Invitrogen-Gibco/BRL).

The composition of DM was reported in a patent [24] filed by Fundação Universidade de Brasília. It was composed of minimum essential medium alpha (alpha-MEM; Invitrogen-Gibco/BRL), supplemented with PVA, 100 ng/mL bovine insulin, 10 ng/mL recombinant IGF-1 (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA), androstenedione, nonessential amino acids (Invitrogen-Gibco/BRL), 5 µg/mL transferrin, 1.4 ng/mL sodium selenium, sodium bicarbonate (Invitrogen-Gibco/BRL), Hepes, and antibiotics (penicillin and streptomycin).

### 2.3. Experimental design

In this study, we analyzed the DM effect on the oocyte maturation process in two steps. In the first step (Experiment 1), called the prematuration period (PMP), a total of 232 COCs were randomly distributed in T1 (NDM) or T2 (DM) and cultured for 24 h at 38.5 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% air atmosphere with 95% humidity. After this culture period, nuclear and cytoplasmic maturation were assessed.

## ARTICLE IN PRESS

I. Oliveira e Silva et al. / *Theriogenology* xx (2010) xxx

3

Table 1  
Ultrastructural characteristics of bovine fresh COCs, COCs cultured for 24 h in NDM (T1), or DM (T2), and COCs cultured for an additional 24 h in NDM (DM+NDM-T3), or DM (DM+DM-T4).

		Fresh COCs (n = 4)	T1 (n = 7)	T2 (n = 6)	T3 (n = 3)	T4 (n = 4)
Cumulus cells	Compact	100 (4)		100 (6) <sup>a</sup>		100 (4) <sup>a</sup>
	Expanded		100 (7) <sup>a</sup>		100 (3) <sup>a</sup>	
PvS	Small	100 (4)	28.57 (2) <sup>a,a</sup>	66.67 (4) <sup>a,a</sup>	100 (3) <sup>c</sup>	50 (2) <sup>a,a</sup>
	Conspicuous		71.43 (5) <sup>a,a</sup>	33.33 (2) <sup>a,a</sup>		50 (2) <sup>c,a</sup>
Microvilli	Bent	100 (4)		16.7 (1) <sup>a,a</sup>		25 (1) <sup>a,a</sup>
	Erect/Bent		28.6 (2) <sup>a,a</sup>			25 (1) <sup>a,a</sup>
Mitochondria location	Erect		71.4 (5) <sup>a,a</sup>	83.3 (5) <sup>a,a</sup>	100 (3) <sup>a</sup>	50 (2) <sup>a,b</sup>
	Cortical	100 (4)				
Cortical granule	Cortical/Evenly distributed		14.29 (1) <sup>a,a</sup>	100 (6) <sup>b</sup>		50 (2) <sup>c,a</sup>
	Spread		85.71 (6) <sup>a,a</sup>		100 (3) <sup>b</sup>	50 (2) <sup>a,a</sup>
Cortical granule	Cluster	100 (4)	14.3 (1) <sup>a,a</sup>	50 (3) <sup>a,a</sup>		
	Aligned/Cluster		28.6 (2) <sup>a,b</sup>	50 (3) <sup>a,a</sup>		50 (2) <sup>a,a</sup>
	Aligned		57.1 (4) <sup>a,c</sup>		100 (3) <sup>b</sup>	50 (2) <sup>a,a</sup>

PvS, Perivitelline space.

Data is expressed in percentage of COCs analyzed and the number of COCs used are expressed in the table.

<sup>a-d</sup> Within cytoplasmic maturation characteristics, columns without a common superscript indicate differences among T1, T2, T3 and T4 ( $P < 0.05$ ).

<sup>a,b</sup> Within each group, columns without a common superscript indicate a difference in cytoplasmic maturation characteristics ( $P < 0.05$ ).

As inhibition of meiosis was observed in the T2 pre-matured COCs, a second step (Experiment 2) of culture, namely the resumption period (RP), was performed to evaluate the ability of the COCs to reverse meiosis inhibition. For that, a total of 257 COCs were randomly distributed in T1 (NDM), T3 (DM + NDM), or T4 (DM+DM). The T1 group was cultivated in NDM for 24 h, the T3 group in DM for 24 h followed by cultivation in NDM for an additional 24 h, and the T4 group in DM for 48 h. All batches were cultured at 38.5 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% air atmosphere with 95% humidity. Nuclear and cytoplasmic maturation were assessed at the end of each culture period.

The COC cultures (20 to 25) were grown in four-well plates in 400  $\mu$ L per well without oil. To evaluate the effect of different treatments on nuclear oocyte maturation, 10 and nine replicates from Experiments 1 and 2 respectively were performed, except the group T4 in which four replicates were performed. For cytoplasmic evaluation, different numbers of COCs (shown in parentheses in Table 1) were used.

#### 2.4. Oocyte nuclear maturation evaluation

At the end of the culture period, 489 COCs from pre-maturation and resumption period (Experiments 1 and 2) were denuded and fixed in a solution of ethanol: acetic acid, 3:1 for 48 h. After this, they were transferred to glass slides in small drops. Vaseline and

paraffin were used to maintain the coverslip in contact with the oocytes. Slides were stained with 1% lacmoid for analysis of oocyte nuclear maturation, using a phase contrast microscope at 400x and 1000x magnification [7]. Oocytes were classified according to the immature (germinal vesicle and germinal vesicle breakdown), intermediary (metaphase I to telophase I), and mature (metaphase II) stages.

#### 2.5. Oocyte cytoplasmic maturation evaluation

The COCs of each group (T1, T2, T3, and T4) and fresh COCs (0 h) were prepared to assess the oocyte ultrastructure by transmission electron microscopy ( $n = 24$ ). The COCs were fixed in solution containing 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 3% sucrose, and 5 mM CaCl<sub>2</sub> in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, at room temperature for 1h. Subsequently, COCs were postfixed for 1 h in 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide, and 5 mM CaCl<sub>2</sub> in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH7.2. Then, COCs were stained for 2 h with uranyl acetate 0.5% and then dehydrated in ascending concentrations of acetone (30–100%), and impregnated and embedded in Spurr's epoxy resin. Oocyte sections were stained with uranyl acetate 3% and lead citrate 1%. The semi-thin sections were stained with Toluidine blue and examined using an optical microscope. The sections presenting the mid-section of the oocyte were ultrathin (70nm)-sectioned. Ultrastructural observations were made using a JEOL-

## ARTICLE IN PRESS

4

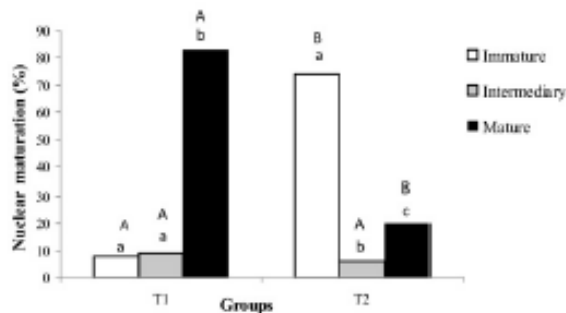
I. Oliveira e Silva et al. / *Theriogenology* xx (2010) xxx

Fig. 1. Nuclear status of bovine COCs ( $n = 232$ ) cultured for 24 h (prematuration period—Experiment 1) in NDM (T1) or DM (T2).

<sup>A,B</sup> Within each nuclear maturation stage, columns without a common superscript indicate a difference between T1 and T2 ( $P < 0.05$ ).

<sup>a,c</sup> Within each group, columns without a common superscript indicate a difference in nuclear maturation stage ( $P < 0.05$ ).

JEM 1011 transmission electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan). Images were acquired with a GATAN BioScan Camera, model 792 (Gatan, Warrendale, IL, USA). We analyzed the cytoplasmic maturation in accordance to Hyttel et al [25] who considered as immature characteristics the small perivitelline space (PvS), bent microvilli, cortical mitochondria location, and the presence of cortical granules clusters. Mature characteristics were considered to be conspicuous PvS, erect microvilli, spread mitochondria, and aligned cortical granules. The characteristics bent/erect microvilli, cortical/evenly distributed mitochondria, and aligned/cluster cortical granules were considered to be mature or in process of maturation, because they were observed in

the control (mature) group of our experiment (T1). In addition to the cytoplasmic organelles analyzed by MET, cumulus expansion was also observed, considering compact: immature or expanded: mature.

### 2.6. Statistical analysis

Differences in oocyte nuclear maturation, as well as ultra structural characteristics, were compared by Chi-square, with the level of significance set at  $P < 0.05$ .

### 3. Results

After the prematuration period (Experiment 1), more than 80% of T1 oocytes had complete nuclear maturation, whereas T2 oocytes had more than 70% immature oocytes (Fig. 1), indicating that DM induced meiosis arrest. To evaluate whether this inhibition of nuclear maturation was reversible, COCs were cultured in NDM (T3) or DM (T4) for an additional 24 h (Experiment 2). After this second period of culturing, T3 (DM + NDM) oocytes had more than 80% mature COCs, which indicated a reversibility of meiotic arrest. The meiotic arrest of the T2 oocytes was not reversible after additional 24 h culture in DM. Approximately 70% of the T4 oocytes (DM + DM) maintained at the immature stage (Fig. 2).

Cytoplasmic characteristics were expressed in percentage of COCs studied (Table 1). Analysis of cytoplasmic maturation is presented in fresh COCs (0 h) with ultrastructural characteristics of immature oocytes according to Hyttel et al [25]. These were presence of cortical mitochondria (Figs. 3a and 3e),

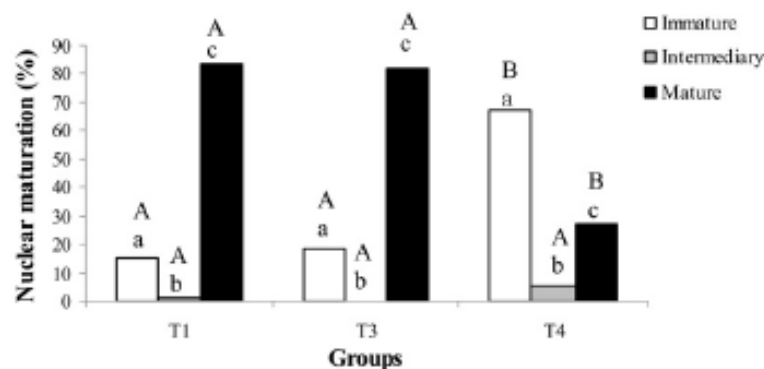


Fig. 2. Nuclear status (%) of bovine COCs ( $n = 257$ ) cultured for 24 h in NDM (T1), cultured for 24 h in DM, followed by 24 h in NDM (T3), or cultured for 48 h in DM (T4; Experiment 2).

<sup>A,B</sup> Within a nuclear maturation stage, columns without a common superscript differed ( $P < 0.05$ ).

<sup>a,c</sup> Within each group, columns without a common superscript indicate a difference in nuclear maturation stage ( $P < 0.05$ ).



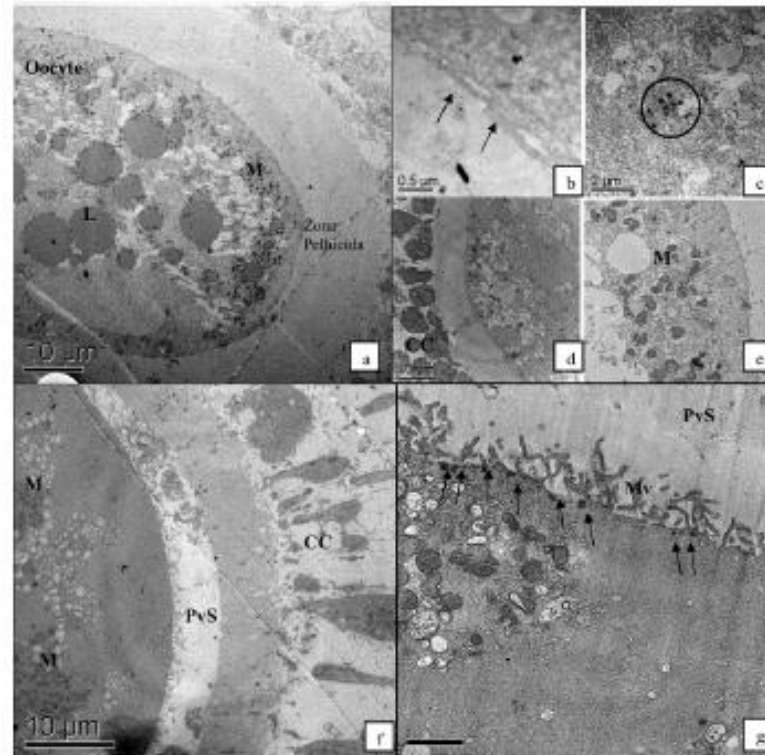


Fig. 3. Electron micrograph showing part of an immature fresh bovine COC (0h)—Fig. a–e; and electron micrograph of an *in vitro* matured control (T1) COC—Fig. f and g. (a) Note the cortical mitochondria (M) and lipid droplets (L). 2000x. (b) Note the bent microvilli (arrows). 50000x. (c) Note the cluster of cortical granules (circle). 15000x. (d) Note the compact cumulus cells (CC). 2500x. (e) Note the cortical mitochondria from Fig. 3a. 5000x. (f) Note the redistribution of the mitochondria (M) throughout the cytoplasm, the perivitelline space (PvS), and the cumulus (CC) expansion. 3000x. (g) Note the alignment of cortical granules (arrows) and the erect microvilli (Mv). 10000x.

cortical granule clusters in the ooplasm (Fig. 3c), and presence of bent microvilli (microvilli packed between the zona pellicula and plasmembrane, which were oriented parallel to the oocyte surface forming a stack). The cumulus cells around the oocytes were compact (Fig. 3d).

After IVM, most T1 COCs were at the MII stage and their cytoplasm displayed characteristics of mature oocyte. There were conspicuous PvS ( $P < 0.05$ ) and mitochondria spread throughout the ooplasm ( $P < 0.05$ ; Fig. 3f), as well as aligned cortical granules and oocyte surface with erect microvilli ( $P < 0.05$ ; Fig. 3g). Complete cumulus expansion ( $P < 0.05$ ; Fig. 3f) was also observed, which characterizes a mature oocyte.

After 24 h of culture in DM (PMP), T2 COCs had both immature and mature characteristics of cytoplasmic maturation. The immature characteristics exhibited by these COCs were absence of cumulus expansion (Figs. 4a and 4b), small PvS, and presence of ooplasm

granule clusters in 50% of analyzed COCs (Fig. 4e). The mature characteristics were the presence of erect and bent/erect microvilli on the plasmembrane (Figs. 4c, 4d, and 4e), cortical/evenly distributed mitochondria throughout the ooplasm (Figs. 4a, 4b, and 4c), and the presence of aligned cortical granules in 50% of analyzed COCs (Fig. 4d).

At the end of RP, T3 COCs had mature characteristics, as mitochondria spread throughout the cytoplasm ( $P < 0.05$ ), cumulus expansion, and alignment of cortical granules (Fig. 4f and 4g).

The T4 group had both immature and mature characteristics. Immature characteristics included compact cumulus cells in all COCs analyzed (Fig. 5a), the small PvS in half of the observed COCs, and bent microvilli (Fig. 5c) in one COC. The mature or in-process-of-maturation characteristics considered were conspicuous PvS (5b and 5d), cortical/eventually distributed (Fig. 5a) or spread (Fig. 5b) mitochondria, and erect microvilli (Fig. 5d).

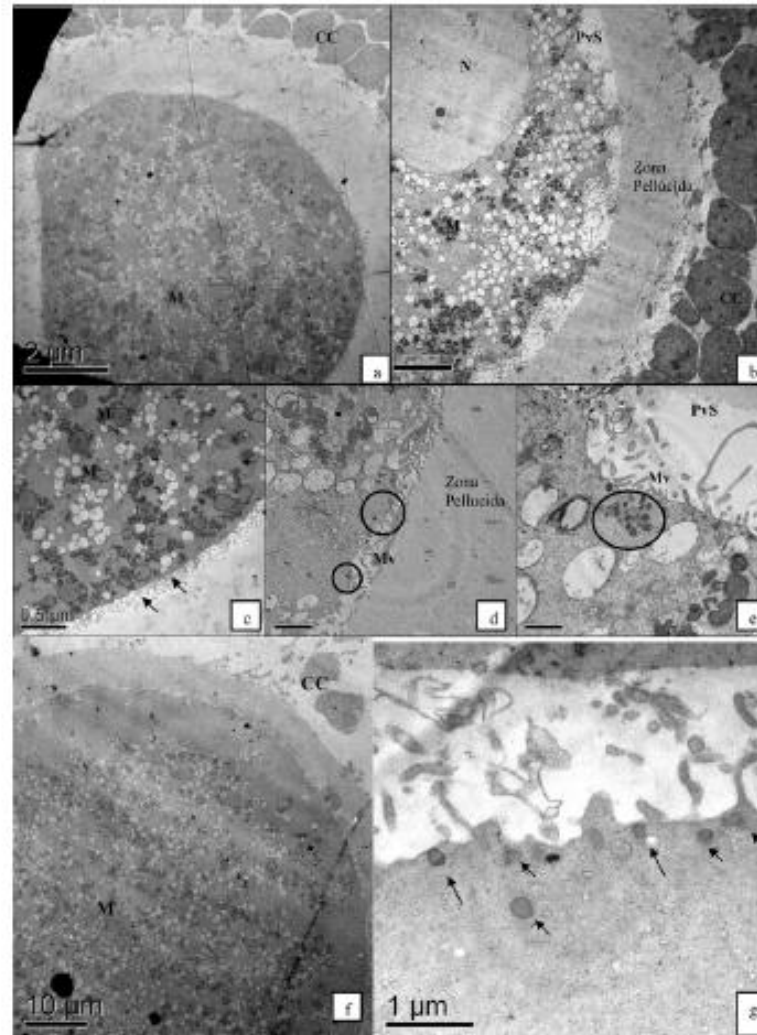


Fig. 4. Electron micrograph of an *in vitro* prematured bovine COC in T2 (DM) (a–e); and electron micrograph of an *in vitro* matured COC in T3 (DM+NDM) (f, g). (a) Note the distribution of mitochondria (dark points—M) throughout the cytoplasm, and the compact cumulus cells (CC). 1500x. (b) Note the nucleus (N), the cortical/evenly distributed mitochondria throughout the cytoplasm (M), the small perivitelline space (PvS), and the compact cumulus cells. 2000x. (c) Note the erect microvilli (arrows) and the mitochondria (M). 5000x. (d) Note the aligned cortical granules (circles) and the erect/bent microvilli. 10000x. (e) Note the cluster of cortical granules (circle) and the erect microvilli (Mv). 10000x. (f) Note the distribution of mitochondria throughout the cytoplasm (dark points—M) and the cumulus (CC) expansion. (g) Note the alignment of cortical granules (arrows).

#### 4. Discussion

Based on the present study, we concluded that *in vitro* culture of immature bovine COCs for 24 h in strictly defined medium (DM) arrested nuclear maturation. Furthermore, this inhibition was completely reversed by an additional 24 h of culture in non-defined medium (NDM), but not in DM. Therefore, meiosis arrest was prolonged by the DM, whereas reversibility was obtained by culturing COCs for an additional 24 h in NDM (Fig. 1 and 2).

It is well known that follicular cells produce inhibitors necessary to maintain the oocyte in meiotic arrest. However, the removal of the oocyte from its follicular environment deprives the oocyte of these inhibitory factors [26]. Perhaps *in vitro* culture conditions which maintained meiosis arrest provided additional time for oocytes undergoing ultrastructural and molecular changes, which are fundamental for acquisition of developmental competence [3]. Many chemical modulators of meiosis progress have been tested for this pur-

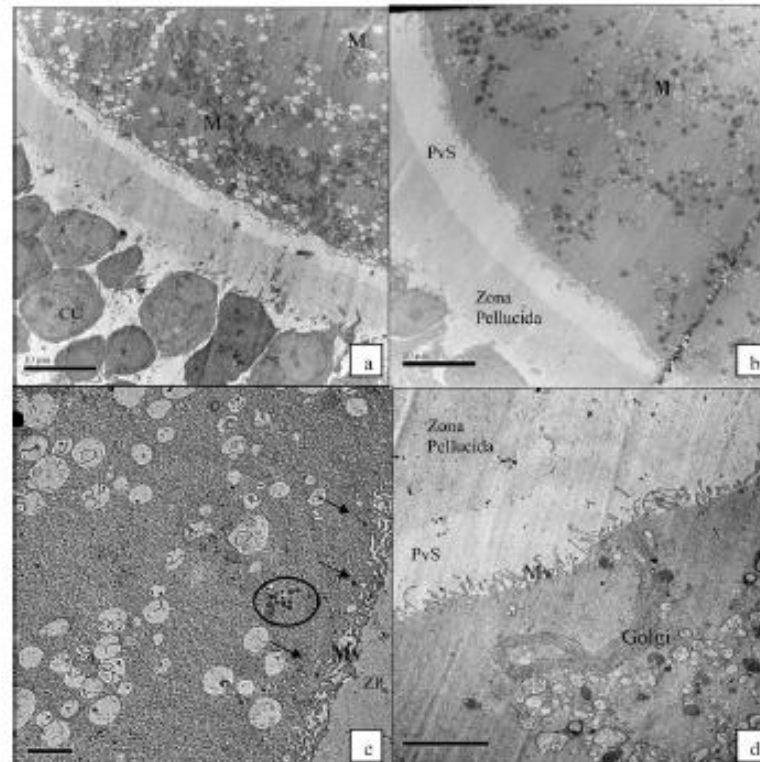


Fig. 5. Electron micrograph of an *in vitro* matured bovine COC in T4 (DM+DM) (a–d).

(a) Note the cortical /eventually distributed mitochondria (dark points), and the compact cumulus cells. 2500x. (b) Note the mitochondria (dark points) spread throughout the cytoplasm, and a conspicuous PvS. 2500x. (c) Note the cortical granule cluster (circle), the aligned cortical granule (arrows), and the bent microvilli (Mv). 8000x. (d) Note the conspicuous PvS and the erect microvilli. 6000x.

pose, including inhibitors of kinase activity or protein synthesis. However, it was noteworthy that some of these decreased the rate of blastocyst production [27,28]. In the present study, the meiosis arrest provided by DM allowed oocytes to maintain meiotic competence without any detrimental effect on subsequent nuclear and cytoplasmic maturation, since arrest was completely reversed after an additional 24 h of culture in NDM (T3).

The ability of oocytes to achieve competence is influenced by the maturation media and its supplements [29]. There were substantial differences among research groups in the composition of IVM medium. Although fetal calf serum (FCS) is commonly added to IVM media, it contains many unknown components which may introduce physiological variability to an IVM system. Furthermore, since there may be differences among serum batches in the success rate of IVM, strict quality control is needed to obtain consistent responses [11]. Thus, there was considerable impetus to

develop a chemically defined medium for oocyte maturation.

To have a valid comparison of *in vivo* and *in vitro* oocyte maturation environments, and to obtain *in vitro* embryo production at the same rate and quality of embryos produced *in vivo*, COCs should be cultured in media which mimics *in vivo* oocyte maturation. This provided the impetus for us to develop a defined medium in which hormones, growth and antioxidant factors were present and stimulated granulosa cells to sustain prolonged estradiol secretion [22], thereby mimicking a growing follicle. In the present study, with the culture of COCs (cumulus cells and oocyte) in DM, inhibition of nuclear oocyte maturation until the gonadotrophin peak was achieved by the additional culture of COCs in NDM (T3). Supplementing NDM with FSH [9] mimicked ovulation and thus complete nuclear maturation was quickly obtained.

In addition to LH and FSH [9], which have fundamental roles in follicular growth and oocyte maturation,

## ARTICLE IN PRESS

other hormones have similar effects, e.g., insulin. Fouladi-Nashta et al. [30] described a system for *in vitro* culture of bovine intact antral follicles supplemented with insulin in which oocytes recovered from follicles cultured for 24 h remained at the germinal vesicle (GV) stage and provided greater frequency of development when compared to oocytes aspirated from fresh follicles. In the present study, the use of DM (which contained insulin) resulted in a peripheral distribution of cortical granules in 50% of COCs (T2 and T4, Table 1). Furthermore, intact follicles cultured with insulin contained nuclear immature oocytes, associated with ultrastructural features, such as peripheral distribution of cortical granules [30], which are usually characteristic of mature oocytes. Insulin, as well as transferrin and selenium that were also present in DM, medium, improved cytoplasmic maturation and developmental competence of embryos when they were added to IVM [31].

It is well known that IGF affects oocyte competence and maturation; it may stimulate resumption of meiosis of porcine and rabbit COCs [32,33]. In horses, the addition of IGF-I to an IVM medium did not increase the rate of nuclear maturation to the MII stage, but exerted a positive effect on cytoplasmic maturation [34]. Furthermore, IGF-I has a regulatory role in ovarian function, ovulation, oocyte cytoplasmic maturation, as well as steroid production [35], in addition to its action as an anti-apoptotic factor during oocyte maturation [36]. Wasielek and Bogacki [36] suggested that the amount of IGF-I produced by cumulus cells during *in vitro* culture was insufficient for maturation, and therefore they concluded that IGF-I supplementation necessary for maturation. In the present study, the DM was supplemented with a physiological concentration of IGF-I, and provided ultrastructural modifications related to cytoplasmic maturation, such as the beginning of mitochondria distribution throughout the cytoplasm (Table 1 and Fig. 5a, 5b).

The main characteristic of cytoplasmic maturation was the shifting of the mitochondria from a peripheral position to a more dispersed arrangement (distributed throughout the cytoplasm). This occurs *in vivo* after the LH surges. Furthermore, it is accompanied by the distribution of cortical granules, which in the GV stage are distributed in clusters throughout the cytoplasm, whereas at the end of the maturation period, they are distributed throughout the inner surface, close to the plasma membrane [37].

The movement of mitochondria to areas of high demand of energy is extremely important, since they

are responsible for the supply of energy that is consumed during the maturation process [37]. Furthermore, the strategic movement of cortical granules in the end of the maturation period is important to prevent polyspermy, since the release of their contents to the outer surface after oocyte activation promotes a rapid modification of the oocyte extracellular matrix that prevents the entry of additional sperm [37].

In a recent study by our team [38], the rate of blastocyst production was similar for oocytes matured in modified DM, and for oocytes matured in medium containing serum. In the present study, we concluded that the DM was a good model to study the events that occur during oocyte prematuration, with no need to use meiosis inhibitors. Furthermore, maintenance of COCs at immature stage *in vitro* without any detrimental effect can be used to provide additional time to study nuclear and cytoplasmic maturation synchrony of IVM. Therefore, allowing oocyte maturation to occur in a two-step procedure using the DM should be investigated as a strategy to improve the rate of viable embryos obtained with *in vitro* fertilization.

#### Acknowledgments

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) and by CNPq (Pronex-DF n° 193000117/2004), FINEP, and Embrapa Dairy Cattle (CNPGL). Ingrid de Oliveira e Silva was a recipient fellow of CAPES of the Medical Sciences Program / University of Brasília. We would like to thank Dr Concepta Margaret McManus Pimentel, of the Agronomy and Veterinary College and Daniele de Souza Kaiser, of Biological Institute of Brasília University for statistical analysis and Marcia Triunfol of Publicase for manuscript suggestions and review.

#### References

- [1] Pincus G, Enzmann EV. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. *JEM* 1935;62:655–75.
- [2] Assey RJ, Hyttel P, Greve T, Purwantara B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol Reprod Dev* 1994; 37:335–44.
- [3] Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tomanek M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. *Theriogenology* 2004;61:329–35.

## ARTICLE IN PRESS

I. Oliveira e Silva et al. / *Theriogenology* xx (2010) xxx

9

- [4] Lonergan P, Dinnyés A, Fair T, Yang X, Boland M. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. *Mol Reprod Dev* 2000;57:204–9.
- [5] Franz LC, Squires EL, Rumpf R, Dode MAN, Seidel Jr GE. Effects of roscovitine in maintaining meiotic arrest in equine oocytes and subsequent maturation rates after inhibition. *Theriogenology* 2002;58:679–83.
- [6] Le Beaux G, Richard FJ, Sirard MA. Effect of cycloheximide, 6-DMAP, roscovitine and butyrolactone I on resumption of meiosis in porcine oocytes. *Theriogenology* 2003;60:1049–58.
- [7] Sirard MA, Coenen K. The co-culture of cumulus-enclosed bovine oocytes and hemisections of follicles: effects on meiotic resumption. *Theriogenology* 1993;40:933–42.
- [8] Sirard MA, Coenen K, Bilodeau S. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology* 1992;37:39–55.
- [9] Sirard MA, Desrosier S, Assidi M. In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. *Theriogenology* 2007;68:71–6.
- [10] Gutiérrez CG, Campbell K, Webb R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol Reprod* 1997;56:608–16.
- [11] Freshney RI. *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique*, 4<sup>th</sup> ed. Wiley-Liss: USA; 2000. 600 p.
- [12] Wang WH, Day BN. Development of porcine embryos produced by IVM/IVF in a medium with or without protein supplementation: effects of extra cellular glutathione. *Zygote* 2002;10:109–15.
- [13] Abeydeera LR, Wang WH, Prather RS, Day BN. Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Biol Reprod* 1998;58:1316–20.
- [14] Hirao Y, Itoh T, Shimizu M, Iga K, Aoyagi K, Kobayashi M, et al. In vitro growth and development of bovine oocyte-granulosa cell complexes on the flat substratum: effects of high polyvinylpyrrolidone concentration in culture medium. *Biol Reprod* 2004;70:83–91.
- [15] Ali A, Sirard MA. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol Reprod* 2002;66:901–5.
- [16] Watson AJ, De Sousa P, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J, et al. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biol Reprod* 2000;62:355–64.
- [17] Downs SM, Dow MP, Fagbohun CF. The meiotic response of cumulus cell-enclosed mouse oocytes to follicle-stimulating hormone in the presence of different macromolecules. *J Exp Zool* 1991;258:373–83.
- [18] Keskinetepe L, Brackett BG. In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol Reprod* 1996;55:333–9.
- [19] Lonergan P, Fair T, Gordon I. Effect of time of transfer to granulosa cell monolayer and cell-stage at 48 h post-insemination on bovine oocyte development following IVM/IVF/IVC. *Proc 8th Conf Eur Embryo Trans Assoc*, Lyon; 1992. p. 178 [abstract].
- [20] Mizushima S, Fukui Y. Fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined maturation medium. *Theriogenology* 2001;55:1431–45.
- [21] Monaghan PCC, Lonergan P, Sharif H, Wahid H, Gordon I. The effect of maturation time on the subsequent in vitro development of bovine oocytes. *Theriogenology* 1993;39:370 [abstract].
- [22] Montrezor LH, Piccinato CA, Rosa e Silva AAM. Polyvinyl alcohol is effective in a defined media long-term bovine granulosa cell culture in the maintenance of 17 beta-estradiol production. *SSR Society for the Study of Reproduction, Annual Meeting*, Baltimore, 2002;28–31 [abstract].
- [23] Blondin P, Sirard MA. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 1995;41:54–62.
- [24] Rosa e Silva AAM, Oliveira e Silva I, Vasconcelos RB, Gulart LVM, Rosa e Silva LG. Meios de cultura para maturação de oócitos de mamíferos, processo de obtenção dos mesmos e processos de inibição-reversão da maturação nuclear e aceleração da maturação citoplasmática e suas aplicações para a produção de embrião *in vitro*. Culture media for mammalian oocyte maturation, process of preparation of the media, process of induction of arrest and reversibility of nuclear maturation and cytoplasmic maturation acceleration and its application on in vitro embryo production. Patent PI number 0803140-1, deposit date 12/05/2008, applicant: Fundação Universidade de Brasília.
- [25] Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 1997;47:23–32.
- [26] Sirard MA, Richard F, Mayes M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology* 1998;49:483–97.
- [27] Dode MAN, Adona PR. Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-DMP. *Anim Reprod Sci* 2001;65:171–80.
- [28] Lonergan P, Khatir H, Carolan C, Mermillod P. Bovine blastocyst production in vitro after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. *J Reprod Fertil* 1997;109:355–65.
- [29] Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Domest Anim* 2003;38:259–67.
- [30] Fouladi-Nashta AA, Campbell KHS. Dissociation of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation by the addition of insulin in cultured bovine antral follicles. *Reprod* 2006;131:449–60.
- [31] Jeong YW, Hossein MS, Bhandari Dilip P, Kim YW, Kim JH, Park SW, Eugene L, Park SM, Jeong YI, Lee JY, Sue K, Hwang WS. Effects of insulin-transferrin-selenium in defined and porcine follicular fluid supplemented IVM media on porcine IVF and SCNT embryo production. *Anim Reprod Sci* 2008;106:13–24.
- [32] Sirotkin AV, Duksova J, Makarevich AV, Kubek A, Bulla J. Evidence that growth factors IGF-I, IGF-II and EGF can stimulate nuclear maturation of porcine oocytes via intracellular protein kinase A. *Reprod Nutr* 2000;40:559–69.
- [33] Yoshimura Y, Ando M, Nagamatsu S, Iwashita M, Adachi T, Sueoka K, Miyazaki T, Kuji N, Tanaka M. Effects of insulin-like growth factor on follicle growth, oocyte maturation and ovarian steroidogenesis and plasminogen activator in the rabbit. *Biol Reprod* 1996;55:152–60.
- [34] Carneiro G, Lorenzo P, Pimentel C, Pegoraro L, Bertolini M, Ball B, Anderson G, Liu I. Influence of insulin-like growth factor-I and its interactions with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on *in vitro* maturation and parthenogenic development in equine oocytes. *Biol Reprod* 2001;65:899–905.

## ARTICLE IN PRESS

10

*I. Oliveira e Silva et al. / Theriogenology xx (2010) xxx*

- [35] Li X, Dai Y, Allen WR. Influence of insulin-like growth factor-I on cytoplasmic maturation of horse oocytes in vitro and organization of the first cell cycle following nuclear transfer and parthenogenesis. *Biol Reprod* 2004;71:1391–6.
- [36] Wasielak M., Bogacki M. Apoptosis inhibition by insulin-like growth factor (IGF)-I during in vitro maturation of bovine oocytes. *J Reprod Dev* 2007;53:419–26.
- [37] Ferreira EM, Vireque, AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 2009;71:836–48
- [38] Vireque AA, Camargo LSA, Serapião RV, Rosa e Silv AAM, Watanabe YF, Ferreira EM, Navarro PAAS, Martin WP, Ferriani RA. Preimplantation development and expression of Hsp-70 and Bax genes in bovine blastocysts derived from oocytes matured in alpha-MEM supplemented with growth factors and synthetic macromolecules. *Theriogenology* 2009;71:620–7.

## Anexo B. Formulação comercial do meio Minimum Essential Medium (MEM) Alpha Medium

### Technical Resources - Media Formulations

#### Minimum Essential Medium (MEM) Alpha Medium (1X) liquid Contains L-glutamine, ribonucleosides and deoxyribonucleosides.

Minimum Essential Medium was developed when Basal Media Eagle was not sufficient to support Hela cells. It was discovered that with certain media supplements, BME could be made to grow a wider variety of cells. MEM incorporates these modifications, such as higher concentrations of amino acids into its formulation. Additional supplementation to MEM has broadened the applications for this medium. Alpha modification of the medium includes the addition of the non-essential amino acids, sodium pyruvate, lipoic acid, ascorbic acid, biotin and vitamin B12.

One useful application for alpha MEM is as a selection media. Dihydrofolate Reductase (DHFR) is an enzyme which is necessary for purine synthesis. In the absence of exogenous purines, this enzyme is required for growth. Alpha MEM minus does not contain the ribonucleosides or the deoxyribonucleosides, and will not support the growth of cells that do not contain the gene to produce DHFR.

**Catalog Number:** 12571048, 12571063, 12571071,

COMPONENTS	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	Molarity (mM)
<b>Amino Acids</b>			
Glycine	75	50	0.667
L-Alanine	89	25	0.281
L-Arginine	211	105	0.498
L-Asparagine-H <sub>2</sub> O	150	50	0.333
L-Aspartic acid	133	30	0.226
L-Cysteine hydrochloride-H <sub>2</sub> O	176	100	0.568
L-Cystine 2HCl	313	31	0.0990
L-Glutamic Acid	147	75	0.510
L-Glutamine	146	292	2.00
L-Histidine	155	31	0.200
L-Isoleucine	131	52.4	0.400
L-Leucine	131	52	0.397
L-Lysine	183	73	0.399
L-Methionine	149	15	0.101
L-Phenylalanine	165	32	0.194
L-Proline	115	40	0.348
L-Serine	105	25	0.238

L-Threonine	119	48	0.403
L-Tryptophan	204	10	0.0490
L-Tyrosine disodium salt	225	52	0.231
L-Valine	117	46	0.393
<b>Vitamins</b>			
Ascorbic Acid	176	50	0.284
Biotin	244	0.1	0.000410
Choline chloride	140	1	0.00714
D-Calcium pantothenate	477	1	0.00210
Folic Acid	441	1	0.00227
i-Inositol	180	2	0.0111
Niacinamide	122	1	0.00820
Pyridoxal hydrochloride	204	1	0.00490
Riboflavin	376	0.1	0.000266
Thiamine hydrochloride	337	1	0.00297
Vitamin B12	1355	1.36	0.00100
<b>Inorganic Salts</b>			
Calcium Chloride (CaCl <sub>2</sub> ) (anhyd.)	111	200	1.80
Magnesium Sulfate (MgSO <sub>4</sub> ) (anhyd.)	120	97.67	0.814
Potassium Chloride (KCl)	75	400	5.33
Sodium Bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	84	2200	26.19
Sodium Chloride (NaCl)	58	6800	117.24
Sodium Phosphate monobasic (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O)	138	140	1.01
<b>Ribonucleosides</b>			
Adenosine	267	10	0.0375
Cytidine	243	10	0.0412



Guanosine	283	10	0.0353
Uridine	244	10	0.0410
<b>Deoxyribonucleosides</b>			
2'Deoxyadenosine	251	10	0.0398
2'Deoxyctidine HCl	264	11	0.0417
2'Deoxyguanosine	267	10	0.0375
Thymidine	242	10	0.0413
<b>Other Components</b>			
D-Glucose (Dextrose)	180	1000	5.56
Lipoic Acid	206	0.2	0.000971
Phenol Red	376.4	10	0.0266
Sodium Pyruvate	110	110	1.000