

ANDRESSA PEREIRA DE SOUZA

**CORDICEPIM NA PRÉ-MATURAÇÃO DE OÓCITOS
BOVINOS: MATURAÇÃO NUCLEAR E DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências
Agroveterinárias da Universidade do Estado de
Santa Catarina, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alceu Mezzalana

**LAGES
2015**

P436c Pereira de Souza, Andressa
Cordicepim na pré-maturação de oócitos bovinos:
maturação nuclear e desenvolvimento embrionário/
Andressa Pereira de Souza. - Lages, 2015.

84 p.: il.; 21 cm

Orientador: Alceu Mezzalira

Bibliografia: p. 70-84

Dissertação (mestrado) - Universidade do
Estado de

Santa Catarina, Centro de Ciências

Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Lages, 2015.

1. Bloqueador meiótico. 2. Maturação oocitária.
3. Pré-maturação. 4. Embriões PIV. I. Pereira de
Souza, Andressa. II. Mezzalira, Alceu. III.
Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa
de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título

CDD: 636.08926 - 20.ed.

ANDRESSA PEREIRA DE SOUZA

**CORDICEPIM NA PRÉ-MATURAÇÃO DE OÓCITOS
BOVINOS: MATURAÇÃO NUCLEAR E DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina.

Banca Examinadora:

Orientador:

Prof. Dr. Alceu Mezzalana
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro:

Prof. Dr. Fabrício Desconsi Mozzaquatro
Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

Membro:

Prof. Dr. Guilherme de Medeiros Bastos
Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

Membro:

Prof. Dr. Maicon Gaissler Lorena Pinto
Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
– EPAGRI

Lages, 27/02/2015.

A minha mãe Gleides
Aparecida de Lima (*in
memoriam*) por ter me
ensinado a ser forte e não a
desistir nunca
Dedico...

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Ivan, por sempre apoiar meus sonhos, me dando suporte, para realizá-los, a minha mãe (*in memoriam*) por estar sempre presente em meus pensamentos, lembrando-me de não desistir nunca, e que apesar das dificuldades, sempre devemos sorrir. Aos meus irmãos Vanessa, Renan e Gelson por sempre estarem ao meu lado.

Ao meu namorado Albert, pela paciência, amor e por me fazer muito feliz, mas principalmente por me dar uma segunda família maravilhosa, Vera e Vanderlei por me acolherem na família com tanto carinho, ao Vini querido que me ensina a cada dia que é possível nos superarmos. A todos meus amigos e familiares pelo incentivo e carinho.

Ao meu orientador, pela confiança, paciência e oportunidade de obtenção deste título, aos professores e amigos Fabrício e Maicon por me ajudarem e me apoiarem durante esse tempo. Aos demais docentes com os quais tive a oportunidade de ampliar meus conhecimentos.

A todos os colegas do Laboratório, em especial Aimê, Ana Carolina, Camila, Carolina, Diana, Joana Kauê, Lain, Laís, Larissa, Luana, Lucas, Luisa, Ramiro, Renata e Rodrigo, pela amizade e por me ajudarem na execução desse trabalho, sem vocês nada teria sido possível. Aos proprietários e funcionários dos matadouros que cederam os ovários para a realização deste trabalho, a UDESC e CAPES por proporcionarem a realização deste.

A todos que fizeram da minha passagem por Lages, um período de crescimento pessoal, técnico e profissional, meu muito obrigada!

RESUMO

PEREIRA DE SOUZA, Andressa. **Cordicepim na pré-maturação de oócitos bovinos: Maturação nuclear e desenvolvimento embrionário.** 2015. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

A produção *in vitro* de embriões tem um forte impacto comercial e preservacionista no Brasil. Entretanto ainda existem barreiras a serem superadas, já que a maturação *in vivo* não é totalmente mimetizada pela maturação *in vitro*. A otimização da maturação pode aumentar a competência e a qualidade embrionária, tornando-os mais criotolerantes. Uma boa alternativa pode ser o bloqueio meiótico reversível. Três experimentos (n = 2848) avaliaram o Cordicepim como bloqueador meiótico para oócitos bovinos, em diferentes meios de cultivo e sua influência no desenvolvimento embrionário. Folículos de 3-8 mm, obtidos por aspiração de ovários de frigorífico foram distribuídos em 4 grupos: Controle (TCM-199 + piruvato, FSH, LH e SFB) MIVCord (TCM-199 + Piruvato, FH, LH, SFB, Cordicepim) TCMCor (TCM-199 + Cordicepim) e TCMCont (TCM-199), seguido de maturação padrão (MIV) por 20 ou 24 horas. O efeito do bloqueio meiótico na produção de embriões foi avaliado pela taxa de clivagem, blastocisto e número total de células. Para avaliação do estágio de maturação, os oócitos foram corados com Hoechst e avaliados por microscopia. Os dados quantitativos foram submetidos à ANOVA e teste de Tukey e os qualitativos ao qui-quadrado, com 5% de significância. O Cordicepim não influenciou as taxas de clivagem (60,7 vs 56,4%) e blastocistos (30,7 vs 24,8%), quando empregado em meio suplementado

(MIVCord). Porém, houve uma redução na taxa de clivagem (42%) e blastocistos (12,1%), quando empregado em meio sem suplementos (TCMCord). Na cinética de maturação nuclear após 6 horas de pré-maturação, apenas o grupo TCMCord manteve a maioria dos oócitos bloqueados (67%). A densidade celular dos embriões produzidos (26 h maturação) nos grupos controle ($189,2 \pm 11,4$), MIVCord ($187,1 \pm 12,1$) e TCMCont ($171,2 \pm 10,4$) não diferiram entre si e foram superiores ao grupo TCMCord ($119,7 \pm 11,4$). Já com 30 h de maturação a densidade celular dos embriões foi semelhante entre os grupos controle 30 ($224,2 \pm 17,5$) e TCMCord 30 ($240,1 \pm 10,4$). Porém, mesmo com 24 h de maturação padrão, apenas 64,8% dos oócitos do grupo TCMCord 30 completaram a maturação, enquanto no grupo controle 100% maturaram. Conclui-se que 6 h de pré-maturação em cordicepim, na ausência de suplementos, inibe parcialmente a meiose em oócitos bovinos, porém esta inibição não é revertida com êxito mesmo após 24 horas de maturação padrão na ausência de cordicepim. O cordicepim reduz a produção de embriões *in vitro* com 26 h de maturação. Já com 30 h de maturação, o Cordicepim não influencia a taxa de produção embrionária. Ainda, o cordicepim impede de forma irreversível a expansão das células do *cumulus*.

Palavras-chave: Bloqueador meiótico, Maturação oocitária, Pré-maturação, Embriões PIV.

ABSTRACT

PEREIRA DE SOUZA, Andressa. **Cordicepim in bovine oocytes pre-maturation: nuclear maturation and embryo development.** 2015. 84f. Master Dissertation in Animal Science – Area: Animal Production – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

The *in vitro* embryo production has a strong commercial and preservationist impact in Brazil. However, there are still barriers to be overcome, since the *in vitro* maturation does not mimic the *in vivo* maturation. The maturation optimization increases the embryo competence and quality, making them more cryotolerant. The meiotic blockage, after oocytes removal from their follicular environment, may be a good alternative. Three experiments (n = 2848) evaluated the Cordicepim as a meiotic blocker in bovine oocytes in different culture media, and its influence on embryonic development. Follicles 3-8 mm diameter, were punctured from abattoir ovaries and allocated into 4 groups: Control (TCM-199 + pyruvate, FSH, LH and SFB); MIVCord (TCM-199 + Pyruvate, FH, LH, FCS, Cordicepim); TCMCor (TCM-199 + Cordicepim) and TCMCont (TCM-199), followed by standard maturation (IVM) for 20 or 24 h. The effect of meiosis blockage in embryo production was assessed by cleavage and blastocyst rate, and total number of cells assessed. To evaluate the stage of maturation, oocytes were stained with Hoechst and evaluated by microscopy. Quantitative data were analyzed by ANOVA and Tukey test and the qualitative data by chi-square, with 5% significance. Cordicepim did not affect cleavage (60.7 vs. 56.4%) and blastocysts (30.7 vs. 24.8%) rates when added

to supplemented medium (MIVCord). However, there was a reduction in cleavage (42%) and blastocysts (12.1%) rates when added to a medium without supplements (TCMCord). On the kinetics of maturation after 6 hours of pre culture, only TCMCord group maintained most oocytes blocked. Cell density of the produced embryos (26 h maturation) in MIVcont groups (189.2 ± 11.4), MIVCord (187.1 ± 12.1) and TCMCont (171.2 ± 10.4) did not differ and were higher than TCMCord group (119.7 ± 11.4). Already, with 30 h maturation cell density was similar between embryos from control group (224.2 ± 17.5) and TCMCord group (240.1 ± 10.4). However, even with 30 h maturation, only 64.8% of the oocytes completed maturation in TCMCord group, while 100% matured in Control group. We conclude that 6 h of culture in cordicepim in the absence of gonadotropins, partially inhibits the meiosis in oocytes, and this inhibition is not successfully reversed even after 24 hours of maturation pattern in the absence of cordicepim. The cordicepim reduces embryo production when *in vitro* maturation is performed for 26 h. However, within 30 h maturation time, the Cordicepim does not affect embryo production rate. Yet, the cordicepim prevents the *cumulus* cells expansion in an irreversible manner.

Key-words: Meiosis blockage, Oocyte maturation, Pre-maturation, IVP embryos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Modelo para a manutenção da retenção da meiose no estágio de vesícula germinativa (GV) em folículos antrais. O AMPc e o GMPc produzidos pelas células da granulosa são transferidos para o oócito via junções gap. O aumento nos níveis de GMPc inativam a PDE3, aumentando o nível de AMPc no oócito, ativando a PKA, esta por sua vez inativa a fosfatase Cdc25B resultando na fosforilação do CDK1 e inativação do MPF. 41

Figura 2 – Modelo representativo da indução da retomada da meiose pela ação do LH em oócitos. A ruptura das junções gap entre as células da granulosa, do *cumulus* e oócitos, reduz a transferência de GMPc para o oócito, que leva à ativação da PDE3 e a redução dos níveis intraovocitários de AMPc, inativando a PKA, e ativando a cdc 25 fosfatase tendo como resultado a desfosforilação da Cdk 1 e ativação do MPF, induzindo a retomada da meiose.....43

Figura 3 – Avaliação dos estágios da meiose de oócitos corados com Hoechst 33342 A: Vesícula Germinativa- VG; B: Vesícula Germinativa Rompida- VGBD; C: Metáfase I- MI; D: Metáfase II- MII.....52

Figura 4 – Blastocisto em D9 corado com com Hoechst 33342, para contagem do número total de células.....53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos submetidos à pré-maturação por 6 horas sem Cordicepim, em meios com (MIV) e sem (TCM) suplementos, seguido de 20 horas de maturação padrão.....57

Tabela 2 – Bloqueio meiótico de oócitos bovinos submetidos a pré-maturação por 6 horas em Cordicepim, em meio suplementado (MIV) ou não (TCM).....58

Tabela 3 – Maturação nuclear de oócitos bovinos submetidos a pré-MIV por 6 horas em Cordicepim, em meio suplementado (MIV) ou não (TCM) seguido de 20 horas de maturação padrão.....59

Tabela 4 – Desenvolvimento embrionário de oócitos submetidos à pré incubação por 6 horas em cordicepim (TCMCord) e maturados por 24 horas adicionais, em relação a oócitos submetidos a 30 horas de maturação padrão.....60

Tabela 5 – Progressão meiótica de oócitos bovinos após 30 horas de maturação, comparando o pré-maturação por 6 horas em cordicepim (TCMCord) com a maturação padrão (Controle).....61

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A I = Anáfase I
AC = Adenil ciclase
AMPc = Adenosina Monofosfato cíclico
ATP = Trifosfato de adenosina
°C= Graus Celsius
CCOs= Complexo *cumulus*-oócito
CGPs= Células Germinativas primordiais
Cdc= ciclo de divisão celular
Cdk = quinase dependente de ciclinas
CIV = Cultivo *in vitro*
CO₂ = Dióxido de carbono
6- DMAP = 6- Dimetilaminopurina
EGF = Fator de crescimento epidermal
FF = Fluido folicular
FIV = Fecundação *in vitro*
FSH = Hormônio folículo estimulante
GMPc = Guanosinammonofosfato cíclico
GPCR = Receptor da proteína G acoplada
GVBD = Quebra da vesícula germinativa
IBMX = 1- isobutil, 3- metilxantina
LH= Hormônio luteinizante
M I= Metáfase I
MII= Metáfase II
MAPK= Proteína ativada por mitógenoquinase
MPF = Fator de promoção da maturação
MIV= Maturação *in vitro*
mL= Mililitro
mm= Milímetro
mM= Milimol
N= Número
N₂= Nitrogênio

O₂= Oxigênio

PAP= poli-a polimerase

PDE = fosfodiesterase

PIV= Produção *in vitro* de embriões

PKA=Proteína quinase A

PKC= Proteína quinase C

SFB= Soro fetal bovino

SOF = Fluido sintético do oviduto

SPOM = *Simulated physiological oocyte maturation*

T I= Telófase I

TCM 199.= *Tissueculturemedium199*

VG= Vesícula germinativa

VGBD = Vesícula germinativa rompida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	29
2	OBJETIVOS.....	32
2.1	OBJETIVO GERAL.....	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
3.1	OOGÊNESE.....	33
3.2	FOLÍCULOLOGÊNESE.....	34
3.3	MATURAÇÃO E COMPETÊNCIA OOCITÁRIA..	36
3.4	CONTROLE DA MATURAÇÃO.....	39
3.5	BLOQUEIO MEIÓTICO.....	43
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.1	LOCAL DO EXPERIMENTO.....	48
4.2	REAGENTES E QUÍMICOS.....	48
4.3	OBTENÇÃO DOS OÓCITOS.....	48
4.4	PRÉ-MATURAÇÃO - SUBMISSÃO AO BLOQUEIO MEIÓTICO.....	49
4.5	MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	50
4.6	ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA.....	50
4.7	CULTIVO <i>IN VITRO</i>	50
4.8	AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	51
4.9	AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DA MATURAÇÃO NUCLEAR.....	51
4.10	DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR..	52
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
4.12	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	54
4.12.1	Experimento 1: Efeito do cordicepim na produção de embriões bovinos.....	54
4.12.2	Experimento 2: Avaliação da cinética da maturação nuclear dos oócitos submetidos à 6 horas de bloqueio meiótico.....	54

4.12.3	Experimento 3: Avaliação da cinética da maturação nuclear e do desenvolvimento embrionário dos oócitos submetidos a maturação de 30 horas.....	55
5	RESULTADOS.....	56
6	DISCUSSÃO.....	62
7	CONCLUSÃO.....	69
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

INTRODUÇÃO

O Brasil é líder mundial na produção *in vitro* de embriões (IETS, 2012). Assim existe um forte impacto comercial e preservacionista desta tecnologia. Entretanto a produção *in vitro* de embriões apresenta limitações que precisam ser superadas. A maturação *in vitro* (MIV) é um dos gargalos das biotécnicas reprodutivas, já que os oócitos são privados das mudanças que ocorrem durante os períodos de dominância e pré-ovulação e, por consequência, apresentam menor competência.

A competência do oócito, bem como o acúmulo de componentes necessários para o início do desenvolvimento embrionário, são adquiridos durante a maturação (GONÇALVES, 2009), o que não é completamente mimetizado no processo *in vitro*. Isto resulta em estruturas com assincronia núcleo-citoplasmática e menor competência. A maturação *in vitro* reflete na qualidade e sobrevivência de oócitos (MEN *et al.*, 2002; GARDNER *et al.*, 2007) e embriões (DE MATOS *et al.*, 1996; NEDAMBALE *et al.*, 2006) ao processo de criopreservação, bem como na sua viabilidade após transferência (MARTINEZ *et al.*, 1998; VAJTA e KUWAYAMA, 2006).

Uma metodologia de maturação *in vitro* mais eficiente aumentaria a competência, a qualidade e o número de blastocistos, bem como os tornaria mais criotolerantes. Uma das alternativas é manter o bloqueio meiótico após a remoção dos oócitos do ambiente folicular, ou atrasar a sua maturação nuclear (ADONA *et al.*, 2008). O bloqueio meiótico forneceria um tempo adicional para o oócito sofrer as modificações bioquímicas e estruturais necessárias para suportar a fecundação e ter desenvolvimento embrionário normal (DIELEMANN *et al.*, 2002). Ainda, os inibidores da meiose podem ser utilizados em outras biotécnicas, como a criopreservação de oócitos. Não está definido qual é o estágio

de maturação mais adequado para o congelamento do oócito. Sabe-se que o resfriamento e a exposição de oócitos maturados aos crioprotetores podem induzir a uma instabilidade dos fusos meióticos, provocando uma segregação anormal dos cromossomos, produzindo anormalidades (PICKERING e JOHNSON, 1987). O bloqueio ainda pode ser utilizado no transporte dos oócitos obtidos por aspiração folicular, ou após a criopreservação. Nesta situação, os bloqueadores da meiose evitariam o início da maturação em condições inadequadas.

Inibidores fisiológicos da maturação nuclear têm sido amplamente testados (LE BEAUX *et al.*, 2003), como o líquido folicular (GONÇALVES, 2009) e hemi-seções foliculares (OLIVEIRA E SILVA, 2008). Já entre os bloqueadores farmacológicos, encontram-se os ativadores da Adenil Ciclase (AC) como o forskolin (PASCHOAL, 2013), inibidores do fator de promoção da maturação (MPF), como a 6-dimetilalaminopurina (6 DMAP), a roscovitina e a butirolactona-I (BARRETO, 2008, ADONA, 2006) e inibidores da fosfodiesterase (PDE), como a cilostamida, 1-isobutil, 3- metilxantina (IBMX) (GUIMARÃES, 2013).

Inibidores de tradução, ou de síntese protéica, são considerados os mais potentes inibidores da maturação espontânea de oócitos bovinos (FULKA *et al.*, 1986; TATEMOTO *et al.*, 1994). A poliadenilação é o mecanismo responsável pelo controle da tradução e pelo armazenamento dos transcritos no ooplasma. O processo de poliadenilação envolve complexos eventos moleculares que resultam na adição de adeninas à porção terminal 3' do mRNA, constituindo a cauda poli-A, a qual está implicada na estabilidade, no transporte e na atividade traducional do transcrito (VASSALI e STUTZ, 1995; BENOIT *et al.*, 2005). O Cordicepim é um análogo sintético da adenosina, com a falta de um grupamento hidroxila em sua estrutura (JAGGER *et al.*, 1960), que o torna um bloqueador da tradução do RNAm. Alguns fatores importantes no reinício da meiose seguem esse padrão de

tradução, dentre eles a ciclina B e o C-MOS. Essas proteínas são responsáveis pela transdução de sinal do Fator de promoção da maturação (MPF) e da Proteína ativada por mitógeno quinase (MAPK)(KRISCHEK e MEINECKE, 2002). Baseado nesse conhecimento é razoável supor que a utilização Cordicepim, favoreça a maturação *in vitro* do oócito bovino e consequentemente o desenvolvimento embrionário.

Neste contexto, este trabalho busca estabelecer a capacidade do Cordicepim como bloqueador meiótico de oócitos bovinos, avaliando sua ação em diferentes meios de cultivo, bem como sua influência no desenvolvimento embrionário, buscando um sistema de maturação mais eficiente, que melhore a produção *in vitro* de embriões bovinos, e que também possa ser utilizado em outras situações.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer um protocolo de pré-maturação de CCOs bovinos imaturos em cordicepim, visando aumentar a competência dos oócitos utilizados na produção *in vitro* de embriões.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a eficácia do Cordicepim como inibidor da maturação nuclear em meio TCM-199 suplementado (piruvato, FSH, LH e SFB) ou não, por um período de 6 horas;

Avaliar a reversibilidade do processo inibição da progressão da meiose de CCOs previamente tratados com Cordicepim através do cultivo destes na ausência do inibidor;

Verificar o efeito da pré-maturação de oócitos bovinos na presença do bloqueador meiótico Cordicepim no posterior desenvolvimento embrionário *in vitro*;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 OOGÊNESE

Define-se como oogênese a sequência de eventos pelos quais as células germinativas primordiais passam até atingirem o estágio de oócito maduro, apto para a fecundação (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Este processo inclui sete passos: 1) geração das células germinativas primordiais (CGPs); 2) migração das CGPs para as gônadas em formação; 3) colonização das gônadas pelas CGPs; 4) diferenciação das CGPs em oogônias; 5) proliferação das oogônias; 6) início da meiose; 7) retenção da meiose no estágio de diplóteno da prófase I.

A oogênese em mamíferos inicia-se na fase fetal, onde as células germinativas primordiais (CGP), de origem extragonadal, migram do saco vitelínico, para as cristas genitais, onde irão colonizar as gônadas ainda em desenvolvimento. Durante essa migração as CGP sofrem extensiva proliferação celular, através de uma série de divisões mitóticas e quando chegam os cordões sexuais primários sofrem diferenciação e são chamados de oogônias (SADEU *et al.*, 2006). Nesse período os oócitos entram em processo de meiose, diferenciando-se em oócitos primários.

Os oócitos primários passam pelas fases de leptóteno, zigóteno e paquíteno, subsequentemente para o estágio de diplóteno da prófase da primeira divisão meiótica e progridem para um estágio de quiescência prolongada, chamado de estágio dictióteno, permanecendo assim até pouco antes da ovulação (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

As principais mudanças que ocorrem durante a fase de desenvolvimento do oócito são: formações das junções gap entre o oócito e suas células somáticas circundantes, desenvolvimento e deslocamento do complexo de Golgi para a periferia do oócito, desenvolvimento do retículo

endoplasmático liso e das gotas lipídicas, formação dos grânulos corticais e zona pelúcida, diferenciação da mitocôndria, quebra dos centríolos, transcrição e acúmulo de RNAm maternos, que serão utilizados posteriormente para a síntese de proteína do oócito e do desenvolvimento embrionário inicial (FAIR *et al.*, 1996; HYTTEL *et al.*, 1997).

Na puberdade o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH), induz o término da primeira meiose, através do rompimento da vesícula germinativa, passando pelos estágios de metáfase I, anáfase I, telófase I e metáfase I, quando ocorre a expulsão do primeiro corpúsculo polar e a formação do oócito secundário, iniciando a segunda divisão meiótica. Nesse estágio ocorre a segunda interrupção da meiose, permanecendo assim até o momento da fecundação (LONERGAN *et al.*, 1994, CHOHAN; HUNTER, 2004, VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Esta por sua vez só se completará após a ativação pelo espermatozóide durante a fecundação (VAN DEN HURK; ZHAO 2005).

Com a entrada do espermatozóide no citoplasma durante a fecundação, o oócito completa a sua segunda divisão meiótica, com a extrusão do segundo corpúsculo polar. A ploidia retorna a sua configuração inicial, (2n) com a interação do material genético materno e paterno (singamia), formando assim o zigoto, que dará origem ao embrião (ADONA, 2006).

3.2 FOLÍCULOGÊNESE

A folículo gênese pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Ela se inicia após e termina antes da oogênese e pode ser dividida em duas fases: a fase pré-antral, que é subdividida em ativação dos folículos primordiais e crescimento dos folículos primários e secundários; e a fase antral, subdividida em crescimento inicial e terminal dos

folículos terciários, de Graaf ou pré-ovulatório (MARTINS *et al.*, 2008).

Os folículos primordiais são formados no período fetal, quando uma única camada de células pavimentosas (células pré-granulosas) circunda o oócito primário, em torno dos 90-130 dias de gestação (MEYES, 2002). A ativação dos folículos primordiais corresponde à passagem do pool de folículos quiescentes de reserva, para o pool de folículos em fase de crescimento. No entanto o mecanismo de ativação dos folículos primordiais ainda não está claro, mas logo que o estoque de folículos é formado o recrutamento ocorre como um evento diário e contínuo, que uma vez iniciado, não é interrompido até o final da vida do animal ou até a exaustão dos folículos do ovário (GREENSWALL; ROY, 1994).

Com a ativação dos folículos primordiais, as células precursoras da granulosa que rodeiam os oócitos se transformam em células da granulosa cubóides e começam a se proliferar, determinando a diferenciação dos folículos primordiais para folículos primários (HIRSHFIELD, 1991). Se o folículo continua seu crescimento as células da granulosa do folículo primário aumentam em número e tornam-se mais volumosas, dando origem aos folículos secundários (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

Com o crescimento folicular as células da granulosa secretam um líquido que se acumula nos espaços intercelulares, separando as células e formando o antro, sendo esta uma característica dos folículos antrais, que são os folículos terciários. O líquido antral serve como uma importante fonte de substâncias regulatórias derivadas de secreções das células foliculares, como esteróides, enzimas, glicoproteínas, lipoproteínas e fatores de crescimento (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

No decorrer do desenvolvimento folicular, mesmo permanecendo em prófase I o crescimento do oócito é contínuo, pois ele cresce cerca de 20µm no folículo primordial

(LUCCI *et al.*, 2002) e até cerca de 124 μ m em folículos de 1-3 mm, enquanto que folículos maiores que 8,0 mm possuem oócitos com uma média de 129 μ m (CAIXETA, 2009).

O período final do desenvolvimento folicular antral é caracterizado por três fases distintas e dependentes de gonadotrofinas que se desenvolvem em ondas, conhecidas como recrutamento, seleção e dominância.

A fase de recrutamento refere-se ao início da elevação das concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH). Neste momento os folículos medem entre 1 a 3 mm (JAISWAL *et al.*, 2004). Quando o folículo apresenta o diâmetro de 7-8 mm inicia-se a fase de desvio, que é caracterizado pelo crescimento contínuo de apenas um folículo, e seleção onde este que passa a exercer dominância sobre os demais, inibindo o crescimento dos folículos subordinados e inibindo o recrutamento de novos folículos (FAIR, 2003). A fase final de crescimento do folículo pré-ovulatório está associada à alta frequência dos pulsos de LH (HYTTEL *et al.*, 1997) e subsequente liberação de um oócito maduro durante a ovulação (SIRARD *et al.*, 2006).

3.3 MATURAÇÃO E COMPETÊNCIA

O processo de maturação compreende uma série de eventos nucleares e citoplasmáticos (GOTTARDI; MINGOTI, 2009), que são estimulados principalmente por hormônios gonadotróficos (MERTON *et al.*, 2003). O objetivo é formar uma célula haplóide (bloqueada em metáfase II - MII), apta a ser fecundada (DE CESARO, 2013).

A retomada do ciclo celular retido na meiose I é mediada por um estímulo hormonal *in vivo*, em resposta ao pico pré-ovulatório de LH, em oócitos inclusos em folículos pré-ovulatórios completamente diferenciados. Porém, *in vitro*, esse processo é desencadeado independentemente de

hormônios, simplesmente pela retirada do oócito de dentro do folículo (PINCUS; ENZMANN, 1935).

A maturação nuclear se refere à retomada da meiose, progredindo da fase de diplóteno da prófase da primeira meiose (prófase I), passando pelos estádios de metáfase I, anáfase I telófase I até metáfase II (MII) (MINGOTI, 2000). No intervalo que compreende os estádios de prófase I a metáfase II, os cromossomos condensam e o envelope nuclear é desfeito marcando o início da maturação nuclear (MEINECKE *et al.*, 2001; JONES, 2004). Nessa fase, os cromossomos homólogos são divididos, sendo que metade do número de cromossomos permanece no oócito (célula haplóide) e a outra metade é liberada no primeiro corpúsculo polar, havendo novamente o bloqueio do ciclo celular até a fecundação (SIRARD, 2001).

In vitro, os oócitos bovinos levam de 18 a 24 horas para completar a MII após serem retirados dos folículos. A quebra da vesícula germinativa ocorre entre 8-12 horas, a MI de 12-15 horas, a AI e TI de 15-18 horas e MII de 18-22 horas após a retirada do ovócito do ambiente folicular (DODE; ADONA, 2001).

A maturação citoplasmática, por sua vez, é necessária para o bloqueio da polispermia, para descondensar a cabeça do espermatozóide, formar os pró-núcleos e permitir o desenvolvimento embrionário. Inclui a redistribuição de organelas celulares, a migração das mitocôndrias para uma posição perinuclear e o acúmulo de grânulos corticais no oócito (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

Além disso, marcantes alterações na síntese de proteínas específicas são observadas no oócito bovino, sendo que uma complexa cascata de fosforilação e desfosforilação esta envolvida na regulação da retomada da meiose. Nesse período observa-se a degradação da adenosina monofosfato cíclico (AMPC), aumento dos níveis de cálcio e aumento na atividade de proteínas quinases. A proteína denominada de fator de promoção da maturação (MPF) é responsável pelo

início da maturação, atuando de forma que assegure que o ciclo celular prossiga de forma correta (KUBELKA *et al.*, 2000).

O MPF é um composto dimérico formado por uma subunidade regulatória que é a ciclina B e uma subunidade catalítica que é a quinasep34cdc2 dependente de ciclina (CDK1) (BILODEAU-GOELSELS, 2012). Ele é ativado pela desfosforilação da treonina-14 e da tirosina-15, cuja reação é catalisada pela enzima cdc 25 fosfatase (DAI *et al.*, 2000). O MPF é um dos principais reguladores das alterações morfológicas durante a maturação oocitária, regulando a condensação dos cromossomos, o rompimento do envelope nuclear, a reorganização dos microtúbulos e outras organelas citoplasmáticas com a participação de outras proteínas (KRISCHEK; MEINECKE, 2002; KUBELKA *et al.*, 2002).

A variação da atividade do MPF pode ser detectada nos oócitos bovinos durante a maturação. Sua atividade é baixa em VG passando a ser observada no início do rompimento da VG. Alcança um pico no estágio de metáfase I e declina sua atividade durante a transição entre os estádios de metáfase I e metáfase II (KUBELKA *et al.*, 2000).

Na maturação *in vitro*, oócitos que atingem o estágio de metáfase II, nem sempre estão aptos ao desenvolvimento embrionário normal após a fecundação, isso porque nem todos adquiriram sua plena competência.

A competência oocitária compreende a capacidade do oócito em retomar a meiose, de clivar após a fecundação, suportar os primeiros estágios de desenvolvimento embrionário, até a ativação do seu genoma e induzir uma gestação (FARIN *et al.*, 2007; SIRARD *et al.*, 2006; MINGOTI, 2000). Essa competência oocitária é adquirida gradativamente durante os estágios finais da foliculogênese. Portanto para que o oócito seja capaz de sofrer a maturação completa é essencial que ele tenha completado toda a sua fase de crescimento (ADONA, 2006). Entretanto o momento em que ela se completa e quais os mecanismos envolvidos ainda não estão claros.

Mudanças moleculares podem ser responsáveis pelo aumento na competência dos oócitos, já que durante o crescimento oocitário há um alto grau de atividade transcricional (SONG; WESSEL, 2005), especialmente nas primeiras fases de desenvolvimento. Esses eventos estão relacionados principalmente à síntese de RNAm e proteínas. Porém a transcrição no oócito diminui marcadamente antes da maturação e, a partir deste ponto, continua em nível bem menor (BESSA *et al.*, 2013; SIRARD, 2001).

No oócito, ao contrário do que ocorre com qualquer célula somática, o intervalo entre a síntese e a utilização do RNA e moléculas protéicas pode ser de até várias semanas, ocorrendo o armazenamento dessas moléculas em uma forma quiescente para o seu emprego no tempo certo ao longo da maturação do oócito e desenvolvimento embrionário inicial (PICTON *et al.*, 1998). Portanto, a competência do oócito se refere a sua capacidade de desenvolvimento e está, em parte, determinada pela composição e quantidade de transcritos específicos no seu pool de mRNA, que são estocados durante o crescimento e fase final do desenvolvimento folicular (SIRARD *et al.*, 2006; LONERGAN *et al.*, 2003). Isso sugere que os transcritos e proteínas que foram estocados não são substituídos, pelo contrário, são gradualmente traduzidos ou degradados sendo importantes na fecundação e desenvolvimento embrionário até o momento em que o embrião seja capaz de ativar seu genoma (SIRARD *et al.*, 2006; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012).

3.4 CONTROLE DA MATURAÇÃO *IN VITRO*

A retomada da meiose em oócitos bovinos ocorre de forma abrupta *in vitro*, após sua remoção do ambiente folicular, provavelmente devido à perda da interação morfológica, hormonal e molecular entre o oócito e as células foliculares (GOTTARDI; MINGOTI, 2009).

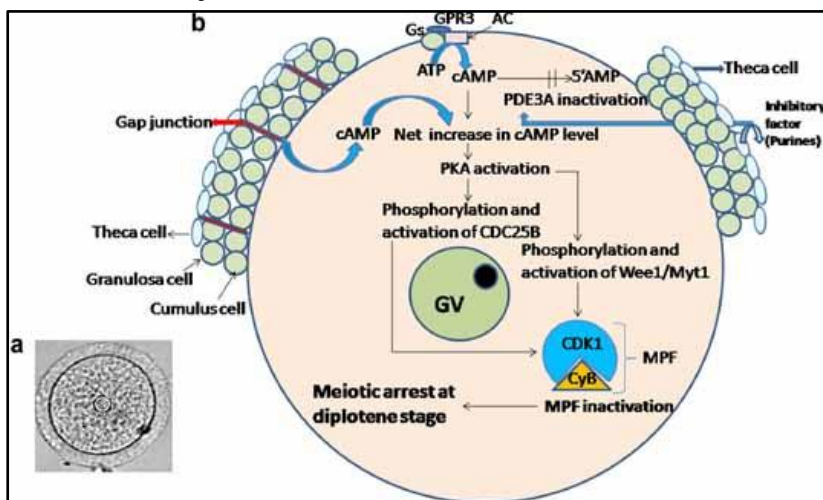
Depois que cresce o oócito precisa ser mantido em VG durante o resto da folículo-gênese, que é garantido pela alta concentração intraovocitária de monofosfato de adenosina cíclica (AMPc) (TRIPATHI *et al.*, 2010). Já o mecanismo que envolve o reinício da meiose está associado à redução nas concentrações de AMPc (CONTI *et al.*, 1998). O AMPc que está envolvido ao bloqueio e reinício da meiose é produzido pelas células da granulosa, mas as células da teca também contribuem na amplificação desse sinal (ADONA, 2006). A concentração de AMPc intraovocitário é regulada pelo equilíbrio entre a atividade de dois tipos de enzimas: Adenil ciclase (AC) e fosfodiesterase (PDE), que são responsáveis pela síntese e degradação do AMPc, respectivamente (CONTI *et al.*, 2002).

O AMPc gerado pelas células da granulosa é transferido para o oócito através das junções gap, sendo que até recentemente se achava que a transferência contínua das células da granulosa para o ovócito via junções gap era o único responsável por manter a retenção da meiose (CHAUBE, 2002). No entanto, tem sido demonstrado que a concentração de AMPc intraovocitário, gerado pela atividade da AC, que é estimulada pela ativação de receptores de proteína G estimulatória (GPCRs/GPR3) presentes na membrana do oócito (LI *et al.*, 2012; TRIPATHI *et al.*, 2010), é indispensável para manter a retenção da meiose (VACCARI *et al.*, 2008).

Para que ocorra o bloqueio da meiose, os receptores acoplados a proteína G (GPR3) estimulam a enzima adenilato ciclase a sintetizar a cAMP. Os níveis elevados de cAMP no oócito, tornam a proteína quinase A (PKA) ativa, a qual promoverá a fosforilação do complexo CDK1/CiclinaB mantendo o MPF inativo e o núcleo em estágio de VG (MEHLMANN, 2005; BILODEAU-GOESEELS, 2012). Outro fator que também está envolvido no nível de AMPc dentro do oócito é a guanosina monofostato cíclica (GMPc), oriunda das células da granulosa e da teca. Essa chega através das junções

gap ao oócito e contribui para manter altos os níveis de AMPc, por inibir a ação da PDE 3 e, conseqüentemente, a hidrólise do AMPc (BILODEAU-GOESEELS, 2011; NORRIS *et al.*, 2009).

Figura 1 – Modelo para a manutenção da retenção da meiose no estágio de vesícula germinativa (GV) em folículos antrais. O AMPc e o GMPc produzidos pelas células da granulosa são transferidos para o oócito via junções gap. O aumento nos níveis de GMPc inativam a PDE3, aumentando o nível de AMPc no oócito, ativando a PKA, esta por sua vez inativa a fosfatase Cdc25B resultando na fosforilação do CDK1 e inativação do MPF.

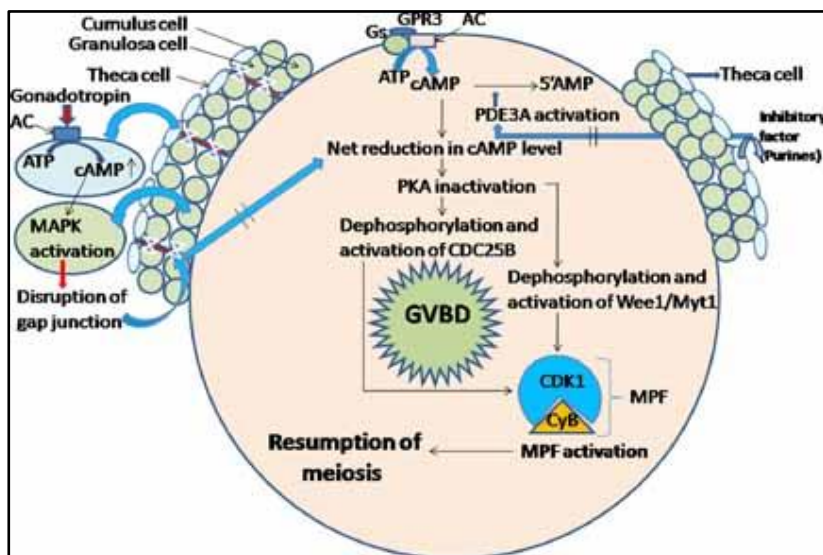


Fonte: modificado de Tripathi *et al.*, 2010.

O contrário ocorre no processo natural de maturação em mamíferos, independente se esta se inicia pela descarga de LH (*in vivo*), ou simplesmente pela retirada do oócito do ambiente folicular (*in vitro*).

O aumento nos níveis de AMPc estimula à atividade da PKA/PKC e consequentemente a produção de fatores semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF) nas células do *cumulus*. Esses fatores semelhantes ao EGF induzem a atividade da MAPK que rompe as junções gap entre células do *cumulus*-granulosa e entre células do *cumulus*-oócito. Lopes (2012) comprovou que a PKC participa da via de sinalização da retomada da meiose em oócitos bovinos, e sugere a participação do EGF nesta via. A interrupção da comunicação entre *cumulus* e oócito impede a transferência de AMPc e GMPc. A redução de GMPc ativa a PDE3A que por sua vez reduz, por hidrólise, os níveis de AMPc produzidos pelo oócito. A redução do AMPc do oócito reduz a atividade da PKA, que ativa a fosfatase Cdc25B que inativa a quinase Wee1/MytI resultando na desfosforilação da CDKI e ativação do MPF. A ativação do MPF induz a retomada da meiose (TRIPATHI *et al.*, 2010).

Figura 2 – Modelo representativo da indução da retomada da meiose pela ação do LH em oócitos. A ruptura das junções gap entre as células da granulosa, do *cumulus* e oócitos, reduz a transferência de GMPc para o oócito, que leva à ativação da PDE3 e a redução dos níveis intraovocitários de AMPc, inativando a PKA, e ativando a cdc 25 fosfatase tendo como resultado a desfosforilação da Cdk 1 e ativação do MPF, induzindo a retomada da meiose.



Fonte: modificado de Tripathi *et al.*, 2010.

3.5 BLOQUEIO MEIÓTICO

Na produção de embriões *in vitro*, a maioria dos oócitos bovinos são provenientes de folículos de 2 a 6 mm de diâmetro (ADONA; LEAL, 2004; DALVIT *et al.*, 2005). A remoção dos oócitos dos folículos antes de finalizarem a foliculogênese é,

provavelmente, um dos fatores responsáveis pela redução da competência oocitária. Para contornar a foliculogênese interrompida a que os oócitos são submetidos, uma alternativa seria simular as condições intrafoliculares, mantendo-os por um determinado período com a mesma configuração nuclear (ADONA, 2006).

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

A inibição da meiose pode ser induzida pelo uso de inibidores fisiológicos, tais como a presença de hemi-folículos e líquido folicular, ou métodos farmacológicos, como o uso de substâncias que atuam em etapas distintas da via que mantém o MPF inativo (GUIMARÃES, 2013).

Desde 1935 já é sabido que o oócito reinicia a meiose ao ser retirado do ambiente folicular, o que sugere a existência de fatores intrafoliculares que inibem a retomada da meiose prematuramente (PINCUS; ENZMAN, 1935). No intuito de mimetizar o ambiente folicular, vários estudos avaliaram o efeito do fluído folicular (FF), co cultivo com células da teca e da granulosa e de hemi-folículos no sistema de maturação *in vitro*. Sirard *et al.* (1992); Sirard e First, (1988) demonstram que a presença de fluido folicular no meio de maturação reduziu em 22% (56% x 74%) a taxa de quebra da vesícula germinativa (GVBD) nas primeiras 6 horas de cultivo, mas após 21 horas de cultivo, cerca de 91% dos oócitos retomam a meiose mesmo na presença do FF. Já Oliveira e Silva (2008) obteve taxas de retenção meiótica de 81,2% e 96,3% quando utilizou hemi-seções foliculares juntamente com meios

indefinidos (Soro fetal bovino) e definidos (α -MEM+PVA) respectivamente.

Dentre os métodos farmacológicos pode-se citar o uso de substâncias que mantenham altas concentrações de AMPc no interior do oócito, como a 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), cilostamida (BILODEAU-GOESEELS, 2012), inibidores de síntese protéica de maneira não específica, como a cicloheximida (MEINECKE *et al.*, 2001); inibidores de proteínas quinases, como a dimetilaminopurina (6-DMAP) (DODE; ADONA, 2001); e ainda inibidores específicos da fosforilação de proteínas Cdk, como a roscovitina e butirrolactona I (ADONA; LEAL, 2004; BARRETO *et al.*, 2010).

Considerando que o AMPc é o responsável por manter a retenção meiótica, vários agentes moduladores podem ser utilizados com o intuito de elevar os níveis de AMPc (GUIMARÃES, 2013). O Forskolin, fármaco derivado de uma planta asiática denominada *Colleusparaphoskolii*, eleva as concentrações de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) por meio da ativação da adenilatociclase. O uso dessa substância inibiu ou pelo menos atenuou a retomada da meiose em oócitos bovinos (PASCHOAL, 2013; LUCIANO *et al.*, 2004), murinos (NOGUEIRA *et al.*, 2003), suínos (BAGG *et al.*, 2006) e humanos (SHU *et al.*, 2008), sendo eficaz para a manutenção do oócito em VG por 24 horas sem afetar o desenvolvimento embrionário. Paschoal (2012) utilizando três concentrações diferentes de forskolin: 0,025 mM; 0,05 mM e 0,1 mM, durante um período de 6 horas, demonstrou a reversibilidade do forskolin após o bloqueio.

Ainda no grupo dos agentes moduladores do AMPc encontramos substâncias inibidoras da PDE, enzima responsável pela degradação do AMPc do oócito. Portanto, o AMPc pode ter seus níveis elevados, através da exposição dos oócitos a substâncias inibidoras da PDE, não específicas, como o IBMX, ou específicas, como a cilostamida ou milirone

(PDE3) ou o rolipram (PDE4) (GILCHRIST; THOMPSON, 2007).

O IBMX, receptor não específico da PDE, previne a degradação de AMPc, retendo a meiose de forma transitória (SIRARD; FIRST, 1988). Esse efeito transitório pode ser observado em CCOs bovinos cultivados com IBMX por 8 horas, entretanto, esse efeito não é mais perceptível às 24 horas de cultivo (BILODEAU *et al.*, 1993). Por outro lado, inibidores específicos da PDE-3 como o milrinone e da PDE-4 como o rolipram, preveniram a degradação do AMPc em oócitos bovinos, resultando em seu acúmulo nas células do *cumulus* e no oócito, mantendo estáveis as junções gap e atrasando a retomada da meiose (THOMAS *et al.*, 2002).

A ativação do MPF é o ponto chave da retomada da meiose em oócitos bovinos. Sua ativação depende tanto da síntese protéica, quanto dos eventos em cascata de desfosforilação/fosforilação, consequentemente a prevenção da atividade do MPF nestes dois pontos de controle leva ao bloqueio da progressão da meiose (LONERGAN *et al.*, 1997). Neste contexto encontram-se inibidores da fosforilação de proteínas CDKs, como a roscovitina e butirolactona I (ADONA; LEAL, 2004, BARRETTO *et al.*, 2007). Estes inibidores possuem o mesmo mecanismo de ação, que é a competição por sítios de ligação de trifosfato de adenosina (ATP), impedindo a ligação do ATP necessária para as atividades de fosforilação, o que impede a ativação do MPF (PONDERATO *et al.*, 2001; MEIJER, 1996). Ambos os inibidores mantém uma alta proporção de oócitos em VG por um período de 24 horas ou mais (ADONA, 2006; BARRETO, 2008; GOTTARDI, 2009).

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 são considerados os mais

potentes inibidores da maturação espontânea de oócitos bovinos (FULKA *et al.*, 1986; TATEMOTO *et al.*, 1994).

Dentre eles encontra-se o Cordicepim, um análogo sintético da adenosina, produto do metabolismo de fungos, mais precisamente da cepa *Codyceps militares*. O metabólito dessa cepa vem sendo usado em diversos ramos da pesquisa científica desde anti-fúngico a antibiótico, pois quando adicionado ao meio de cultivo celular ele inibe a tradução do RNAm (SUGAR; MCCAFFREY, 1998). Essa inibição ocorre devido à falta do grupo 3'-OH na estrutura do Cordicepim, uma vez que a PAP reconhece o inibidor como uma adenosina e o integra ao final da região 3' não traduzível. Isso impede que mais adenosinas se liguem a essa porção, evitando o alongamento da cauda poli-(A) o que impede a tradução do RNAm. O Cordicepim se mostrou adequado no bloqueio meiótico reversível de oócitos bovinos por um período de 12 horas, sem afetar o posterior desenvolvimento embrionário (SANDRI, 2007).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido no laboratório de reprodução animal Prof. Assis Roberto de Bem, localizado no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, em Lages SC.

4.2 REAGENTES E QUÍMICOS

Exceto quando indicado, todos os reagentes utilizados para este experimento, bem como os produtos químicos utilizados para a preparação dos meios de maturação *in vitro*, ativação partenogenética e cultivo *in vitro* foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

4.3 OBTENÇÃO DOS OÓCITOS

Os ovários foram obtidos em abatedouros e transportados até o laboratório em recipiente térmico contendo solução salina 0,9% (NaCl) à uma temperatura de 28-30° C. No laboratório os ovários foram lavados em solução salina 0,9% acrescida de 100UI/mL de Penicilina G e 0,1mg/mL de Sulfato de Estreptomicina.

Para recuperação dos complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) foram aspirados folículos de 2-8 mm de diâmetro, com auxílio de bomba de vácuo, acoplada a um escalpe de 19-Gauge. O material aspirado foi depositado em tubos cônicos de 15 ml, e após a sedimentação, o mesmo foi transferido para placas estéreis de poliestireno de 96 mm de diâmetro para busca e recuperação dos oócitos, sob lupa estereoscópica. A seleção foi realizada em líquido folicular, previamente centrifugado a 4000 g, (KC4, Kindly®, São Paulo, SP, Brasil) por 5 minutos. Oócitos com *cumulus* compacto, possuindo pelo

menos quatro camadas de células do *cumulus* e com citoplasma homogêneo foram então selecionados para serem utilizados para a maturação. Os CCO selecionados foram depositados em placas de 35 mm de diâmetro contendo TCM-Hepes adicionado ou não de Cordicepim na concentração de 79,6 nM/ml conforme o delineamento experimental.

4.4 PRÉ-MATURAÇÃO - SUBMISSÃO AO BLOQUEIO MEIÓTICO

Para a pré-maturação quatro meios diferentes foram utilizados. Os oócitos foram cultivados por um período de 6 horas em meio TCM-199 suplementado com piruvato, FSH, LH e SFB (MIV) ou não suplementado (TCM-199), e adicionado de cordicepim (Cord) ou não (Cont).

1- MIV (Controle): Meio de Maturação TCM-199 - sais de Earle adicionado de 26,2 mM de NaHCO_3 , 25 mM de HEPES, 0,2 mM de piruvato de sódio com 0,01 UI de FSH/mL (Folltropin Bioniche, Canada), 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de LH (Lutropin Bioniche, Canada) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (meio de maturação padrão para o acompanhamento da Maturação).

2- MIVCord: Meio de Maturação TCM-199 - sais de Earle adicionado de 26,2 mM de NaHCO_3 , 25 mM de HEPES, 0,2 mM de piruvato de sódio com 0,01 UI de FSH/mL (Folltropin Bioniche, Canada), 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de LH (Lutropin Bioniche, Canada) e 10% de soro fetal bovino (SFB), acrescido de Cordicepim na concentração de 79,6 nM/ml (20 $\mu\text{g/mL}$).

3- TCMCont: Composto somente de Meio de Maturação TCM-199 - sais de Earle adicionado de 26,2mM de NaHCO_3 , 25 mM de HEPES (sem adição dos demais suplementos e cordicepim).

4- TCMCord: Meio de maturação TCM 199 sais de Earle adicionado de 26,2mM de NaHCO_3 , 25 mM de HEPES (livre

de piruvato, FSH, LH e SFB) e complementado com cordicepim na concentração de 79,6 nM/ml (20 ug/ml)

4.5 MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV)

Os oócitos foram submetidos à maturação padrão por um período de 20, 24, 26 ou 30 horas, de acordo com o grupo experimental. A maturação foi realizada em placas de cultivo de 4poços (NUNC®, Denmark), sendo que cada poço continha 400 µL de meio de maturação (MIV) composto por TCM-199sais de Earle adicionado de 26,2mM de NaHCO₃, 25 mM de HEPES, 0,2 mM de piruvato de sódio, 0,5mg/mL LH (Lutropin-V/ Bioniche Animal Health), 0,01UI/mL de FSH (Folltropin-V/Bioniche Animal Health, Belleville Ontario, Canada), 10% de SFB, em estufa a 38,5°C em atmosfera com 5% de CO₂ em ar com umidade saturada.

4.6 ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA

Após 26 ou 30 horas de maturação, foi realizada a ativação partenogenética. Primeiramente os oócitos foram desnudados, lavados em TCM-199 Hepes e então transferidos para placas de cultivo contendo TCM-199- Hepes suplementado com 10% de SFB e 5µM de ionomicina onde permaneceram 5 minutos. Ao término da incubação os oócitos foram lavados em Hepes com 10% de SFB, e submetidos ao cultivo em fluido de oviduto sintético (SOF) suplementado com 5% SFB, 0,2 mM de piruvato, 10 mg/mL de gentamicina e 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) por 3 horas.

4.7 CULTIVO *IN VITRO* (CIV)

Após o término da ativação partenogenética, os presumíveis zigotos de cada tratamento foram lavados em SOF e colocados em poços contendo 400 µL de SOF suplementado

com SFB e piruvato, sob óleo mineral, permanecendo em incubação por 7 dias, a 38,5°C. Após a avaliação da clivagem, o cultivo prosseguiu em bolsas impermeáveis (Bags), suplementados com atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% N₂

4.8 AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO *IN VITRO*

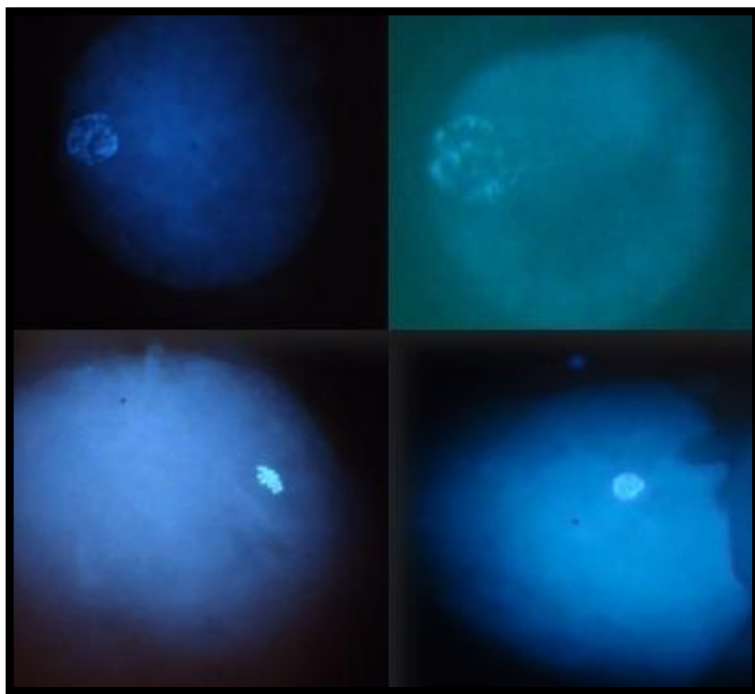
Os critérios de viabilidade utilizados foram à taxa de clivagem e a taxa de blastocisto. A clivagem foi avaliada cerca de 48 horas após a ativação partenogenética (D2). Já a taxa de blastocisto foi avaliada no sétimo (D7) e nono (D9) dia após a ativação partenogenética.

4.9 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE MATURAÇÃO NUCLEAR

Para determinar a cinética de maturação nuclear o estágio da meiose dos oócitos foi avaliado às zero (imediatamente após a seleção), 6, 26 e 30 horas de maturação. Para a avaliação do estágio da meiose, os oócitos foram retirados do cultivo e submetidos a remoção das células do *cumulus*, por pipetagens sucessivas. Posteriormente foram fixados em formol e subsequentemente foram expostos ao corante HOECHST 33342 na concentração de 1µg/ml diluído em PBS (Solução salina fosfatada), onde permaneceram por cinco minutos. Logo após foram colocados entre lâmina e lamínula para avaliação. A avaliação foi realizada sob microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, America Inc., Sapporo, Japão), em filtro WU, com excitações de 450-490 nm e emissão 520 nm em aumento de 1000x e classificados em: vesícula germinativa (VG), vesícula germinativa rompida (GVBD, do inglês, germinal vesicle break down); metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI) e

metáfase II (MII). Foram considerados degenerado/anormais, os oócitos que apresentavam a cromatina com alguma aberração ou que não era possível identificar o estágio.

Figura 3 – Avaliação dos estágios da meiose de oócitos corados com Hoechst 33342 A: Vesícula Germinativa- VG; B: Vesícula Germinativa Rompida- VGBD; C: Metáfase I- MI; D: Metáfase II- MII.



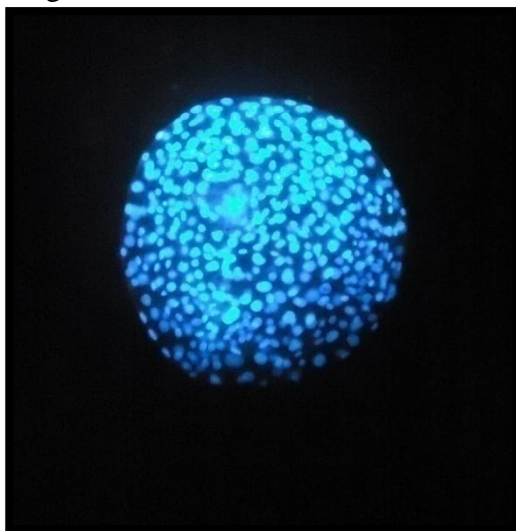
Fonte: próprio autor (2015)

4.10 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR

Para a contagem do número de células foram utilizados os embriões eclodidos em D9. Os embriões foram fixados em formol e em seguida incubados em uma placa de 4 poços

(NUNC®, Denmark) com o corante Hoechst 33342, na concentração de $1\mu\text{g/ml}$ em PBS por 5 minutos, protegidos da luz. Posteriormente os embriões foram transferidos para uma gota de glicerol entre lâmina e lamínula e levados ao microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, America Inc., Sapporo, Japão em filtro WU, com excitações de 450-490nm e emissão 520nm em aumento de 1000x) onde o número de núcleos das células foram contados (Figura 4).

Figura 4 – Blastocisto em D9 corado com Hoechst 33342, para contagem do número total de células.



Fonte: próprio autor (2015)

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As taxas de clivagem, blastocisto e eclosão foram analisadas através do teste de Qui-quadrado. Já os dados da densidade celular foram submetidos à ANOVA e quando

necessário ao teste de Tukey, todos com nível de significância de 5%.

4.12 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.12.1 Experimento 1: Efeito do Cordicepim na produção *in vitro* de embriões bovinos

Neste experimento objetivou-se avaliar o efeito da pré-maturação com bloqueador meiótico no desenvolvimento embrionário. Para o bloqueio da meiose os CCOs foram submetidos a 6 horas de pré-maturação utilizando cordicepim em meios com composições distintas, pra avaliar a capacidade deste em promover o bloqueio em diferentes condições. Essa avaliação foi realizada para determinar qual sistema de pré-maturação seria mais eficiente na produção *in vitro* de embriões. Inicialmente foram utilizados 1668 CCOs, distribuídos em quatro grupos (11 réplicas).

Controle: 6 horas de pré-maturação em meio MIV + 20 horas de MIV (26 horas em meio de maturação padrão para o acompanhamento da Maturação);

MIVCord: 6 horas de pré-maturação em MIVCord + 20 de MIV;

TCMCont: 6 horas pré-maturação em MIVCont +20 horas de MIV;

TCMCord: 6 horas pré-maturação em TCMCord+ 20 horas de MIV;

Após o período de maturação, os oócitos de todos os grupos sofreram ativação partenogenética e foram cultivados *in vitro* (CIV).

4.12.2 Experimento 2: Avaliação da cinética da maturação nuclear dos oócitos submetidos a 6 horas de bloqueador meiótico.

O objetivo desse experimento foi assegurar que o inibidor utilizado (cordicepim) seria capaz de manter a retenção meiótica. Para isso, foram utilizados 456 CCOs, distribuídos de forma semelhante ao primeiro experimento (3 réplicas). Posteriormente, foi avaliado se o período de 6 horas de retenção meiótica (pré-maturação) afetaria a progressão da meiose, seguindo os mesmos grupos experimentais, foram utilizados 423 CCOs, em um total de 4 réplicas.

4.12.3 Experimento 3: Avaliação da cinética de maturação nuclear e do desenvolvimento embrionário de oócitos submetidos à uma maturação de 30 horas.

As diferenças encontrados no experimento 1 e 2 motivaram a realização de um terceiro experimento, que foi dividido em duas etapas. Inicialmente foi avaliado se o aumento do tempo de cultivo total de 26 para 30 horas beneficiaria os oócitos, melhorando a produção de embriões. Um total de 705 oócitos foram distribuídos em dois grupos (4 réplicas).

Controle 30: 30 horas de MIV (meio de maturação padrão para o acompanhamento da Maturação);

TCMCord 30: 6 horas de pré-maturação em TCMCord + 24 horas de MIV

Após o período de maturação, os oócitos de todos os grupos foram ativados partenogeneticamente e cultivados *in vitro*.

A segunda etapa do experimento avaliou a possível reversão do bloqueio meiótico, com o maior tempo de maturação. Foi proporcionado aos oócitos um tempo adicional para a progressão até MII. Utilizando a mesma distribuição anterior, os oócitos após 30 horas de cultivo foram desnudados, fixados e corados para avaliação do estágio da meiose.

5 RESULTADOS

Experimento 1: Efeito do Cordicepim na produção de embriões bovinos

No primeiro experimento foi testado o efeito da pré-maturação em Cordicepim na produção de embriões *in vitro*. Inicialmente o bloqueador Cordicepim foi utilizado em 2 diferentes meios por um período de 6 horas, seguido da maturação padrão por 20 horas.

Quando se utilizou o Cordicepim em meio suplementado, ou seja, acrescido de piruvato, FSH, LH e SFB (MIVCord), o Cordicepim não influenciou nas taxas de clivagem e blastocistos, em relação ao grupo Controle (Tabela 1). Entretanto foi observada uma redução na taxa de clivagem e de blastocistos quando os oócitos foram submetidos à pré-maturação com Cordicepim em meio livre de suplementos (ausência de piruvato, FSH, LH, SFB) (TCMCord). De forma semelhante, a taxa de blastocistos foi menor quando a pré-maturação foi realizada na ausência de suplementos (piruvato, FSH, LH e SFB) bem como de Cordicepim (TCMCont). Ainda, não foi observada diferença na taxa de blastocistos entre os grupos Controle e TCMCont, como demonstra a Tabela 1.

Tabela 1 – Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos submetidos à pré-maturação por 6 horas em Cordicepim, em meios com (MIV) e sem (TCM) suplementos, seguido de 20 horas de maturação padrão.

Tratamento	Oócitos	Clivagem		Blastocistos D7	
	N	n	%	N	%
Controle	424	239	56,4 ^a	105	24,8 ^{ab}
MIVCord	427	259	60,7 ^a	131	30,7 ^a
TCMCont	419	202	48,2 ^b	82	19,6 ^b
TCMCord	398	167	42,0 ^b	48	12,1 ^c

Letras minúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste qui-quadrado $p \leq 0,05$.

Fonte: própria autora.

A qualidade dos embriões produzidos foi avaliada através da sua densidade celular. A contagem foi realizada com embriões eclodidos em D9. A densidade celular dos embriões produzidos nos grupos controle ($189,2 \pm 11,4$), MIVCord ($187,1 \pm 12,1$) e TCMCont ($171,2 \pm 10,4$) não diferiram entre si e foram superiores ao grupo TCMCord ($119,7 \pm 11,4$).

Experimento 2: Avaliação da cinética da maturação nuclear dos oócitos submetidos a 6 horas de bloqueador meiótico.

O segundo experimento avaliou a capacidade do cordicepim em promover o bloqueio meiótico, com 6 horas de exposição em meios com ou sem suplementação (piruvato, FSH, LH e SFB).

A avaliação realizada no tempo zero, isto é, imediatamente antes de serem colocados para a maturação, evidenciou que a maioria dos oócitos apresentavam-se em estágio de vesícula germinativa rompida. Após 6 horas de pré

cultivo, apenas o grupo TCMCord manteve a maioria dos oócitos bloqueados em comparação aos demais grupos (Tabela 2).

Tabela 2 – Bloqueio meiótico de oócitos bovinos submetidos a pré-maturação por 6 horas em Cordicepim, em meio suplementado (MIV) ou não (TCM).

Tratamento	Oócitos N	Imaturos (VG/VGBD)		Intermediário (MI)	
		n	%	N	%
Controle	122	64	52,5 ^{bA}	58	47,5 ^{aA}
MIVCord	130	62	47,7 ^{bA}	68	52,3 ^{aA}
TCMCont	92	42	45,7 ^{bA}	50	54,3 ^{aA}
TCMCord	112	75	67,0 ^{aA}	37	33,0 ^{bB}

Letras maiúsculas diferentes na linha e minúsculas diferentes na coluna indicam diferenças significativas por qui-quadrado ($p \leq 0,05$)

Fonte: própria autora.

Na avaliação procedida ao final do período de 26 horas de maturação, observou-se que praticamente todos os oócitos dos grupos Controle e MIVCord chegaram ao estágio de MII, completando a maturação (Tabela 3). Já no grupo TCMCord houve uma forte redução no percentual de oócitos que completaram a maturação (Tabela 3). Por outro lado, os oócitos do grupo TCMCont também sofreram uma redução na taxa de maturação, sugerindo que o período de 18 horas de maturação foi insuficiente para que os grupos TCMCord e TCMCont conseguissem atingir o estágio de MII.

Tabela 3 – Maturação nuclear de oócitos bovinos submetidos a pré-MIV por 6 horas em Cordicepim, em meio suplementado (MIV) ou não (TCM) seguido de 20 horas de maturação padrão.

Tratamento	Oócitos N	Imaturos (VG/VGBD)		Intermediários (MI/AI/TI)		Maturados (MII)	
		N	%	n	%	N	%
Controle	84	0	0,0 ^{aB}	1	1,2 ^{cB}	83	98,8 ^{aA}
MIVCord	113	0	0,0 ^{aB}	1	0,9 ^{cB}	112	99,1 ^{aA}
TCMCont	95	0	0,0 ^{aC}	11	11,6 ^{bB}	84	88,4 ^{bA}
TCMCord	131	3	2,3 ^{aA}	66	50,4 ^{aA}	62	47,3 ^{cA}

Letras maiúsculas diferentes na linha e minúsculas diferentes na coluna diferem, qui-quadrado $p \leq 0,05$.

Fonte: própria autora.

Experimento 3: Avaliação do desenvolvimento embrionário e da cinética de maturação nuclear de oócitos bovinos submetidos à 30 horas maturação.

Para avaliar a influência do tempo de maturação no desenvolvimento embrionário e na progressão da meiose, optou-se por utilizar o grupo TCMCord, o qual efetivamente conseguiu bloquear a maioria dos oócitos, prolongando o período da maturação para 30 horas. Os resultados demonstraram menor taxa de clivagem do grupo TCMCord30 em relação a do controle30, porém com taxa de blastocistos semelhante (Tabela 4).

Tabela 4 – Desenvolvimento embrionário de oócitos submetidos à pré incubação por 6 horas em cordicepim (TCMCord) e maturados por 24 horas adicionais, em relação a oócitos submetidos a 30 horas de maturação padrão.

Tratamento	Oócitos	Clivagem		Blastocisto	
	N	n	%	N	%
Controle 30	360	196	54,4 ^a	90	25,0 ^a
TCMCord 30	345	153	44,3 ^b	79	22,9 ^a

Letras minúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste qui-quadrado ($p \leq 0,05$).

Fonte: própria autora.

Os embriões obtidos foram submetidos a avaliação da densidade celular. O número de células foi semelhante entre o grupo controle $224,2 \pm 17,5$, em relação ao grupo TCMCord30 ($240,1 \pm 10,4$).

Finalmente, foi avaliada a cinética da maturação dos oócitos submetidos ao a 6 horas de bloqueio meiótico em TCMCord, seguido de 24 horas de MIV. Mesmo com uma maturação de 24 horas em meio de maturação padrão uma parte significativa dos oócitos do grupo TCMCord30 não conseguiram chegar a MII (Tabela 5). Já no grupo controle30 todos os oócitos completaram a maturação, chegando ao estágio de MII.

Tabela 5 – Progressão meiótica de oócitos bovinos após 30 horas de maturação, comparando a pré-maturação por 6 horas em cordicepim (TCMCord) com a maturação padrão (Controle).

Grupos	Total de oócitos	Imaturos (VG/VGBD)		Intermediário (MI/AI/TI)		Maturados (MII)	
		N	%	n	%	n	%
Controle 30	144	0	0,0 ^{bC}	0	0,0 ^{bB}	144	100,0 ^{aA}
TCMCord 30	133	12	9,0 ^{aC}	27	20,3 ^{aB}	94	70,7 ^{bA}

Letras maiúsculas diferentes na linha e minúsculas diferentes na coluna diferem pelo qui-quadrado ($p \leq 0,05$). VG=Vesícula germinativa; VGBD=Vesícula germinativa rompida; MI=Metáfase I; AI=Anáfase I; TI=Telófase I; MII=Metáfase II.

Fonte: própria autora.

Observou-se que em todos os experimentos o grupo TCM sem nenhum suplemento (TCMCont) e o TCM adicionado de cordicepim (TCMCord) apresentaram as células do *cumulus* compactas ao final da maturação.

6 DISCUSSÃO

Inicialmente foi avaliada a produção de embriões utilizando o cordicepim em meio com suplementos (MIVCord) e sem suplementos (TCMCord). O desenvolvimento embrionário foi negativamente afetado pela ausência de suplementos (grupo TCMCord), com resultados inferiores ao grupo MIVCord e controle, tanto para a taxa de clivagem quanto para a taxa de blastocistos (Tabela 1).

Já quando a maturação nuclear foi avaliada após as 6 horas de cultivo em Cordicepim, os oócitos do grupo cultivado com suplementos (MIVCord) não sofreram bloqueio meiótico, contrastando com os dados relatados por Sandri (2007) e Krischek; Meinecke (2002), que observaram 100% de bloqueio.

O grupo cultivado sem suplementos (TCMCord) foi o que proporcionou maior taxa de bloqueio (67%), porém ainda inferior ao esperado. Sandri (2007) obteve 100% de retenção meiótica (VG 36% e VGBD 64%) com cordicepim. Essa diferença pode ser um reflexo das diferentes condições de cultivo, já que o autor realizou a aspiração folicular diretamente em meio contendo cordicepim, diferentemente desse experimento, em que o cordicepim foi inserido no cultivo a partir da seleção dos oócitos. Krischek; Meinecke (2002) demonstraram que a maturação prévia por 3, 6 ou 9 horas, antes da submissão ao Cordicepim resultaram em 21,3%, 86,3% e 85,2% de progressão meiótica dos oócitos. Estes dados podem justificar as baixas taxas de retenção meiótica neste estudo, já que o período desde a aspiração até submissão dos oócitos ao cordicepim foi superior a duas horas. Todavia, os autores não informam o tempo gasto desde a aspiração dos ovários até a submissão ao cordicepim.

O emprego de meio de cultura definido (D-MEM+PVA) promoveu a retenção meiótica (OLIVEIRA E SILVA, 2008), que foi mais efetiva na presença de hemi-

secções de oócitos imaturos. Estes dados estão em acordo com o que foi observado nesse experimento, pois quando foi utilizado TCM sem suplementos e com cordicepim o bloqueio meiótico foi mais eficiente. Em conjunto, estes dados reforçam os efeitos estimulatórios do SFB, bem como a sinergia dos bloqueadores meióticos em meios definidos (sem SFB).

A escolha do tempo para o bloqueio da meiose neste estudo foi definida de acordo com estudos anteriores (SIRARD; FIRST, 1988; SIRARD *et al.*, 1989), que demonstraram que a VGBD ocorre com 6 a 9 horas. A baixa taxa de oócitos bloqueados, evidência a existência de mais de uma via de ativação da meiose, uma vez que a inibição da tradução de mRNA diminuiu as taxas de quebra de vesícula germinativa, mas não impediu completamente a retomada da meiose. Possivelmente o cordicepim interfere na síntese de proteínas que participam da retomada da meiose. Entre as proteínas mais importantes que regulam o mecanismo da maturação oocitária estão as proteínas do complexo MPF e da família das MAPK (JONES, 2004). Alguns estudos mostram que o bloqueio da meiose de oócitos não inibe completamente a síntese (MARCHAL *et al.*, 2001) e fosforilação protéicas (VIGNERON *et al.*, 2004) ou a transcrição (LEQUARRE *et al.*, 2004), deixando clara a participação de outras moléculas no processo de retomada da meiose.

Para determinar a reversibilidade da maturação nuclear, os oócitos foram mantidos na presença de bloqueadores e em seguida cultivados em meios livres dos mesmos, com avaliação da cinética de maturação nuclear, logo após. Foi demonstrado que somente os oócitos do grupo TCMCord não obtiveram progressão meiótica após as 20 horas de maturação. Apenas 47,3% dos oócitos encontravam-se em MII, sendo que a maioria dos oócitos estavam bloqueados em MI, indicando que o efeito inibitório é associado com a finalização, e não com a retomada da meiose. Estes dados corroboram com os dados obtidos no primeiro experimento, sugerindo que os oócitos do

grupo TCMCord foram submetidos à ativação partenogenética antes de atingirem a fase de metáfase II, o que pode ter acarretado os baixos índices de desenvolvimento embrionário encontrados. Possivelmente o tempo em que os oócitos permaneceram no meio de maturação padrão (acrescido de suplementos) não foi suficiente para completar a maturação. Uma segunda explicação seria que a dose utilizada de FSH no meio de maturação convencional não foi suficiente para superar o efeito inibitório do cordicepim. Já está bem estabelecido, que o FSH é o principal coordenador do crescimento e desenvolvimento folicular *in vivo* sendo essencial para a aquisição de competência pelo oócito. Seu papel na maturação é pouco entendido, mas relatos indicam que sua ação é mediada pelas células do *cumulus*. O FSH induz a produção de um sinal nas células somáticas que estimula o oócito a retomar a meiose. Trata-se, portanto de um hormônio estimulatório da GVBD em CCOs, mas não em oócitos desnudos (SIRARD *et al.*, 2007). No sistema SPOM (simulated physiological oocyte maturation), diferentemente da MIV utilizada rotineiramente, os oócitos não maturam de forma espontânea e uma dose relativamente alta de FSH, seguida de uma maturação prolongada é requerida para contrapor os efeitos de inibição causada pelos bloqueadores (ALBUZ *et al.*, 2010). Todavia, estes dados são contraditórios, já que Guimarães (2013), utilizando uma concentração de FSH 10 vezes maior do que a MIV convencional, não observou nenhuma melhora na taxa de clivagem ou de blastocisto.

Curiosamente a não expansão das células do *cumulus* foi observada quando os oócitos foram pré-cultivados em TCMCord, mesmo após 24 horas de maturação na ausência do bloqueador. Essa observação ressalta a hipótese de que os oócitos deste grupo não conseguiriam completar a meiose devido a baixa dose de FSH utilizada no meio de maturação e/ou ainda pelo pouco tempo que permaneceram nesse meio. Considerando que a cascata da maturação de oócitos bovinos

pelo estímulo das gonadotrofinas ocorre nas células do *cumulus* e promove tanto a expansão destas como a quebra da vesícula germinativa (LOPES, 2012), a ausência desta expansão observada nos tratamentos com Cordicepim, na ausência de suplementos, pode estar correlacionada com as baixas taxas de clivagem e blastocistos encontradas. A expansão adequada da matriz extracelular nos CCOs fornece aos oócitos elementos parácrinos e autócrinos que conferem ao oócito maior e melhor capacitação, requeridas em eventos subsequentes como a fecundação (LOPES, 2012). Este fato também foi constatado por Sandri (2007) que observou células dos cúmulos compactas, mesmo após 30 horas de cultivo dos oócitos.

As taxas de desenvolvimento embrionário, retenção e progressão meiótica do grupo MIVCord foram semelhantes ao controle, demonstrando que o cordicepim não foi efetivo quando usado em meio de maturação suplementado com piruvato, FSH, LH e SFB. Possivelmente as gonadotrofinas inibiram a ação do cordicepim. Kubelka *et al.* (2000) relataram que o uso do SFB no meio de maturação resulta na perda parcial da capacidade de bloqueio, pois o soro é composto por diversas substâncias como proteínas, carboidratos, aminoácidos, fatores de crescimento e hormônios (PICTON *et al.*, 2008), além de ser uma fonte de precursores para a síntese de esteróides (HULSHOH *et al.*, 1995, LI *et al.*, 2012). Por outro lado, a presença das gonadotrofinas no meio de maturação poderia estar atuando como um ativador da retomada da meiose, visto que a atuação das gonadotrofinas na maturação se dá de forma sinérgica, atuando sobre mais de uma via de sinalização.

Quando se utilizou TCM sem suplementos e sem cordicepim foi observado que as taxas de blastocisto foram semelhantes ao grupo controle, bem como a progressão da meiose, onde os oócitos encontravam-se em MI. Estes dados confirmam o que foi demonstrado desde meados dos anos 30, por Pincus; Enzmann (1935), que os oócitos de mamíferos

quando removidos de seus ambientes foliculares recomeçam a meiose espontaneamente, mesmo na ausência de estimuladores hormonais. Reforçando esse conceito, Lopes (2012) demonstrou que a maturação *in vitro* sem o tratamento prévio com gonadotrofinas foi suficiente para estimular a retomada da meiose, porém sem a expansão das células do *cumulus*. Nesse grupo também foi observada a não expansão das células do *cumulus*, demonstrando que embora a retomada da meiose possa ocorrer espontaneamente independente de hormônios, a maturação oocitária estimulada pelo FSH/LH é essencial para que a expansão das células do *cumulus* ocorra (LOPES, 2012). Logo após a aspiração e seleção dos CCOs, foi verificado um grande número de oócitos em estágio de VGBD (dados não publicados), corroborando com o descrito por Sirard (1990) e Paschoal (2013). Estes dados estão em desacordo com os descritos por Krischek; Meinecke (2002), que obtiveram 96,8% de retenção da meiose em oócitos analisados logo após a aspiração. Uma possível explicação para este achado pode ser o tempo demasiado desde a coleta dos ovários no abatedouro até a seleção dos oócitos no laboratório, determinando o reinício da maturação nuclear, talvez pelos processos post-mortem do animal (PASCHOAL, 2013). Todavia, estes dados necessitam de comprovação.

Como o tratamento TCM Cord produziu o bloqueio meiótico, porém simultaneamente apresentou baixo desenvolvimento embrionário, avaliou-se o aumento do período de maturação, como forma de reverter o efeito inibitório do cordicepim.

O aumento no tempo de maturação apresentou efeitos positivos no desenvolvimento embrionário e na progressão da meiose. Houve um incremento de mais de 15% na taxa de oócitos que atingiram MII com o período adicional de 4 horas de maturação (64,8 vs 47,3% respectivamente). Estes dados contrastam com trabalhos em que os oócitos bloqueados são posteriormente submetidos à maturação por 18 ou 24 horas,

com índices similares de metáfase II (ADONA; LEAL, 2004; GUIMARÃES, 2013). Do mesmo modo Barreto (2008), não encontrou diferença na taxa de MII quando os oócitos foram maturados por 16 ou 24 horas. Esses autores relatam uma aceleração da meiose após o bloqueio meiótico que, todavia, não foi verificado com o Cordicepim, neste estudo. Essa informação é fundamental para que a fecundação *in vitro* (FIV) possa ser realizada no momento adequado, evitando a fecundação de oócitos envelhecidos, o que prejudica o desenvolvimento embrionário (GUIMARÃES, 2013).

Apesar da taxa de clivagem se manter inferior ao controle, os oócitos pré-cultivados em TCM Cord 30, submetidos à maturação *in vitro* por 24 horas apresentaram taxa de blastocisto similar ao grupo controle, em contraste com o primeiro experimento, em que a taxa de blastocisto do grupo Controle foi 12,7 % maior que a do grupo TCM Cord. Ainda, foi observado que a taxa de blastocistos do grupo TCM Cord, praticamente dobrou em relação ao experimento 1 (22,9% vs 12,1% respectivamente), pelo fato da maturação ser estendida para 24 horas em comparação com as 20 horas de maturação do experimento 1.

O número de células é um dos parâmetros mais utilizados para caracterizar a qualidade de embriões produzidos *in vitro* (BARRETO, 2008). No experimento 1, o número de células foi negativamente afetado pelo tratamento com Cordicepim, na ausência de suplementos (TCM Cord). Já no experimento 3, observou-se que o número de células foi semelhante entre o tratamento TCM Cord 30 e o grupo controle 30, demonstrando um efeito benéfico do tempo de maturação adicional. Ainda, observou-se que a densidade celular dos embriões obtidos no último experimento foi superior às observadas no primeiro experimento, demonstrando a influência dos períodos distintos de realização dos experimentos. Apesar da melhora nos resultados obtidos no experimento 3, não se observou expansão das células do

cumulus. A síntese de proteínas nas células do *cumulus*, ao contrário dos oócitos, continua constante até 44 h de maturação (WU *et al.*, 1996), porém, elas não possuem a capacidade de acúmulo como o oócito, e todo material transcrito é imediatamente usado (SANDRI, 2007). O fato das mesmas permanecerem compactas após 30 horas de cultivo sugere que o cordicepim age sobre a tradução de proteínas ligadas a expansão das células do *cumulus* de forma irreversível.

É importante destacar que o cordicepim não exerceu seu efeito na presença de suplementos (piruvato, FSH, LH e SFB), porém houve expansão das células do *cumulus*. Entretanto na ausência destes, este composto promoveu o bloqueio meiótico, mas sem expansão das células dos *cumulus*. Portanto, é provável que o cordicepim atue na via de sinalização LH/FSH da retomada da meiose.

Assim sendo, são necessários mais estudos para melhor utilização do cordicepim como bloqueador meiótico no pré-cultivo de oócitos bovinos imaturos, buscando uma maior taxa de sobrevivência na produção *in vitro* de embriões.

7 CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos neste estudo pode-se concluir que o cultivo por 6 horas em cordicepim promoveu parcialmente a inibição da meiose em oócitos bovinos, mas somente na ausência de suplementos, porém este processo inibitório não é revertido com êxito mesmo após 24 horas de cultivo na ausência de cordicepim. Ainda, o cordicepim impede de forma irreversível a expansão das células do *cumulus*. A pré-maturação de oócitos bovinos utilizando cordicepim em meio não suplementado, por um período de 6 horas seguido de 20 horas de maturação prejudica a produção de embriões *in vitro*, mas não influencia a taxa de produção embrionária quando os mesmos são maturados por 24 horas.

Entretanto a escassez de trabalhos com inibidores da tradução e síntese protéica em oócitos e a complexidade das vias envolvidas na maturação oocitária exige mais estudos para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

BARRETO, L. S. S. Avaliação dos efeitos da inibição da maturação nuclear e de antioxidantes sobre a maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário.

Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, 2008. 74p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, 2008.

BENOIT, B.; MITOU, G.; CHARTIER, A.; TEMME, C.; ZAEßINGER, S.; WAHLE, E.; BUSSEAU, I.; SIMONELI, W. An essential cytoplasmic function for the nuclear poly(a) binding protein, pabp2, in poly(a) tail length control and early development in *drosophila*. **Developmental Cell**, v.9, p.511-522, 2005

BESSA, I.; NISHIMURA, R.; FRANCO, M.; DODE, M. Transcription profile of candidate genes for the acquisition of competence during oocyte growth in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.11, p. 1-9, 2013.

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

BILODEAU- GOESEELS, S. Cows are not Mice; the role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.78, p.734-743, 2011.

BILODEAU- GOESEELS, S. Bovine oocyte meiotic inhibition before *in vitro* maturation and its value to *in vitro* embryo

production: does it improve developmental competence?
Reproduction in Domestic Animals, v. 47, p. 687-693, 2012.

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

CHAUBE, S. K. Does cAMP act as regulator for oocyte meiotic resumption in mammal? **Journal of Cellular Physiology**, v. 4, p. 74-85, 2002.

CHOHAN, K. R.; HUNTER, A. G. *In vitro* maturation, fertilization and early cleavage rates of bovine fetal oocytes. **Theriogenology**, v.61, p.373-380, 2004.

CONTI, M.; ANDERSEN, C. B.; RICHARD, F. J.; SHITSUKAWA, K.; TSAFRIRI, A. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, p. 9-14, 1998.

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

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**, v. 62, p. 519–532, 2000.

DALVIT, G.; LLANES, S. P.; DESCALZO, A.; INSANI, M.; BECONI, M.; CETICA, P. Effect of alpha-tocopherol and

ascorbic acid on bovine oocyte *in vitro* maturation.

Reproduction in Domestic Animals, v. 40, p. 93-97, 2005.

DE CESARO, M. P. **O sistema peptídeos natriutéticos está presente no complexo *cumulus*-oócitos e regula o reinício da meiose em bovinos**. Santa Maria: Faculdade de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, 2013. 77p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, 2013

DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C.; MOSES, D. F.; MARTINEZ, A. G.; MATKOVIC, M. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and Development**, v.45, p.451-457, 1996.

DIELEMAN, S. J.; HENDRIKSEN, P. J. M.; VIUFF, D.; THOMSEN, P. D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H. M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T. A.; NIEMANN, H.;GADELLA, B. M.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L. Effects of *in vivo* pre-maturation and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v. 57, p. 5-20, 2002.

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

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

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

FARIN, C. E.; RODRIGUEZ, K. F.; ALEXANDER, J. E.; HOCKNEY, J. E.; HERRICK, J. R.; KENNEDY-STOSKOPF, S. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.97-112, 2007.

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

GARDNER, D. K.; SHEEHAN, C. B.; RIENZI, L.; KATZ-JAFFE, M.; LARMAN, M. G. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. **Theriogenology**, v.67, p.64– 72, 2007.

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

GONÇALVES, M. C. **Criopreservação de oócitos e embriões bovinos: efeito do líquido folicular e do beta mercaptoetanol**. Lages: Faculdade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias 2009. 45 p. Dissertação (mestrado) – Faculdade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, 2009.

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

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

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

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**, v.124, p. 43-101, 1991.

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

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

JAGGER, D. V.; KREDICH, N. M.; GUARINO, A. J. Inhibition of Ehrlich mouse ascites tumor growth by Cordicepim. **Cancer Research**, v. 21, p.216-220, 1961

JAISWALL, R. S.; SINGH, J.; ADAMS, G. P. Developmental patterns of small antral follicles in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v.71, p. 1244-1251, 2004.

JONES, K. T. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, p.1-5, 2004.

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

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

KUBELKA, M.; ANGER, M.; KALOUS, J.; SCHULTZ, R. M.; MOTLIK, J. Chromosome condensation in pig oocytes: lack of a requirement for either cdc2 kinase or MAP kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, p. 110-118, 2002.

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

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

LEQUARRE, A. S.; TRAVERSO, J. M.; MARCHANDISE, J.; DONAAY, I. Poly(A) RNA is reduced by half during bovine oocyte maturation but increases when meiotic arrest is

maintained with CDK inhibitors. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 425-431, 2004.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M. P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following oocyte maturation, fertilization and culture *in vitro*. **Molecular and Reproduction Development**, v. 37, p. 48-53, 1994.

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

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

LONERGAN, P.; FAERGE, I.; HYTTEL, P. M.; BOLAND, M.; FAIR, T. Ultrastructural Modifications in Bovine Oocytes Maintained in Meiotic Arrest *In Vitro* Using Roscovitine or Butyrolactone. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64, p. 369-378, 2003.

LOPES, E. **Ação da Proteína Kinase C na maturação de oócitos bovinos**. São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Dissertação (Mestrado) 2012. 79p, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo 2012.

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

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

MARCHAL, R.; TOMANEK, M.; TERQUI, M.; MERMILLOD, P. Effect of cell cycledependent kinases inhibitor on nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, p. 65-73, 2001.

MARTINEZ, A. G.; DE MATOS, C. G.; FURNUS, C. C.; BROGLIATTI, G. M. *In vitro* evaluation and pregnancy rates after vitrification of *in vitro* produced embryos. **Theriogenology**, v.50, p.757-767, 1998.

MARTINS, F. S.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 1, p. 36-49, 2008.

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

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

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

MEINECKE, B.; JANAS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP Kinase Activities in Bovine Oocytes following Protein Synthesis Inhibition.

Reproduction in Domestic Animals, v. 36, p. 18-188, 2001.

MEN, H.; MONSON, R. L.; RUTLEDGE, J. J. Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. **Theriogenology**, v.57, p. 1095-1103, 2002.

MERTON, J. S.; DE ROOS, A. P. W.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P. L.; DIELEMAN, S. J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry.

Theriogenology, v.59, p. 651-74, 2003.

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

NEDAMBALE, T. L.; DU, F.; YANG, X.; TIAN, X. C. Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with β -mercaptoethanol. **Animal Reproduction Science**, v.93, p.61-75, 2006.

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

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

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

PASCHOAL, D. M. **Ação do forskolin em diferentes fases da produção *in vitro*: implicação na meiose oocitária e na vitrificação de embriões bovinos**. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista. 2013. 152p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, 2013

PICKERING, S. J.; JOHNSON, M. H. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. **Human Reproduction**, v.2, p.207-216, 1987.

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

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

PINCUS, G.; ENZMANN, E. V. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*: I. The activation of ovarian eggs. **The Journal of Experimental Medicine**, v.62, p. 665-675. 1935

PONDERATO, N.; LAGUTINA, I.; CROTTI, G.; TURINI, P.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Bovine oocytes treated prior to *in vitro* maturation with a combination of butyrolactone I and roscovitine at low doses maintain a normal developmental capacity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, p. 579-585, 2001.

SADEU, J. C.; CORTVRIND, R.; RON-EL, R.; KASTERTEIN, E.; SMITZ, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v. 85, p. 1130-1141, 2006.

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

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

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

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

SIRARD, M. A.; FLORMAN, H. M.; LEIBFIRE, RUTLEDGE, M. L.; BARNES, F. L.; SIMS, M. L.; FIRST, N. L. Timing of progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.40, p.1257-1263. 1989

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

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

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

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

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

SONG, J. L.; WESSEL, G. M. How to make an egg: transcriptional regulation in oocytes. **Differentiation**, v. 73, p. 1-17, 2005.

SUGAR, A. M.; MCCAFFREY, R. P. Antifungal Activity of 39-Deoxyadenosine (Cordicepim). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 1424-1427, 1998.

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**, v. 42, p. 1141-1148, 1994.

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

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

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

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v.65, p.236 – 244, 2006.

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

VASSALLI, J. D.; STUTZ, A. Awakening dormant mRNAs. **Current Biology**, v.5, p. 476-479, 1995.

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

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