

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INIBIÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR PELA
BUTIROLACTONA I DURANTE O TRANSPORTE DE
OÓCITOS BOVINOS DESTINADOS À PRODUÇÃO *IN*
VITRO DE EMBRIÕES (PIV).**

Fernanda Patrícia Gottardi

Orientadora: Prof^a Dr^a Gisele Zoccal Mingoti

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

**Jaboticabal - SP
Fevereiro 2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Gottardi, Fernanda Patricia
G685i Inibição da maturação nuclear pela butirolactona I durante o transporte de oócitos bovinos destinados à produção *in vitro* de embriões (PIV)/ Fernanda Patrícia Gottardi. – Jaboticabal, 2009
xv, 74 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientadora: Gisele Zoccal Mingoti
Banca examinadora: Joaquim Mansano Garcia, Flávio Vieira Meirelles
Bibliografia

1. Maturação *in vitro*. 2. Butirolactona I. 3. Bovinos. I. Título II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: INIBIÇÃO DA MATUREÇÃO NUCLEAR PELA BUTIROLACTONA I DURANTE O TRANSPORTE DE OÓCITOS BOVINOS DESTINADOS À PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIV)

AUTORA: FERNANDA PATRÍCIA GOTTARDI

ORIENTADORA: Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em MEDICINA VETERINÁRIA área de REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:


Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI


Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA


Dr. FLÁVIO MEIRA MEIRELLES

Data da realização: 19 de fevereiro de 2009.


Presidente da Comissão Examinadora
Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FERNANDA PATRICIA GOTTARDI - nascida em Jundiaí – SP, ao dia 5 do mês de setembro de 1983; concluiu o ensino médio no Colégio Thathi-COC, na cidade de Araçatuba – SP, em dezembro de 2000. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba-SP, em março de 2001. Concluiu o curso superior em Medicina Veterinária em dezembro de 2006. Durante a graduação realizou estágio de iniciação científica sob orientação da Prof^a Ass. Dr^a Gisele Zoccal Mingoti, junto à disciplina de fisiologia dos animais domésticos, com bolsa de iniciação científica da FAPESP, processo n^o 2004/112490. Ingressou no curso de pós-graduação, nível de Mestrado, sob orientação da Prof^a Ass. Dr^a Gisele Zoccal Mingoti, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Câmpus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – UNESP, em março de 2007, com bolsa de mestrado da FAPESP, processo n^o 2007/58577-8. Realizou estágio docência na faculdade de Medicina Veterinária na UNESP-Araçatuba junto a disciplina de fisiologia do animais domésticos I durante o segundo semestre de 2008. Aprovada em Exame de Seleção em setembro de 2008, no curso de Pós-graduação, ao nível de Doutorado; iniciará as atividades em março de 2009, no Programa de Medicina Veterinária, Área de concentração em Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV, Câmpus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – UNESP.

AGRADEÇO E DEDICO...

À Deus,
por escrever certo em linhas tortas para que nelas eu me fortaleça.

Aos meus pais,
Maria Cecília D. R. Gottardi e Alcides Fernando Gottardi,
pelo amor e dedicação, e principalmente pela prioridade destinada a minha educação, a
minha mais preciosa herança.

Ao meu irmão,
Paulo Eduardo Gottardi,
pelo companheirismo de um verdadeiro Irmão.

Ao meu amor,
Sammy Sidney Rocha Matias,
pelo apoio, carinho e amizade. “Meu orientador extra-oficial!”

Ao meu presentinho de Deus,
Leka – minha gata,
por me acompanhar por todos os caminhos com carinho e alegria.

AGRADECIMENTOS

A minha amiga orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Gisele Zoccal Mingoti, pela confiança, dedicação e ensinamentos que serão levados por toda vida profissional.

Ao Prof. Dr. César R. Éssper, pelos ensinamentos, orientações e respeito.

Ao Prof. Dr. Joaquim M. Garcia pela dedicação e conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Flávio Meirelles pela disponibilidade em participar da defesa e sugestões.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista, e a todos do departamento de Reprodução Animal – DRA pela oportunidade oferecida e colaborações.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista e a todos os funcionários e professores por fazerem parte do meu crescimento e tornarem esse local minha segunda casa.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - **FAPESP** -, pelo apoio financeiro.

Aos funcionários Adão e Pedro (Tatu) pela disponibilidade em buscar o material de trabalho necessário aos experimentos.

A Prof^ª. Dr^ª. Sílvia Helena Venturoli Perri e ao Prof. Dr. José Carlos Barbosa pelas ajudas na análise estatística.

Aos pós-graduandos do DRA: Clara, Juliana Borges, Juliana, Letícia, Mabel, Marcelo, Max, Maria Emília, Michele, Tatiane, pelo convívio e troca de conhecimentos.

Aos demais amigos de Jaboticabal: Fernanda, Sabryna Calazans, Sabrina, Simone e Jesus pelo abrigo, convivência e amizade.

Aos amigos do laboratório de Araçatuba: Alessandra, Beatriz, Fabrício, Fabrine, Larissa, Rafael e Sheila pela companhia durante todo tempo no laboratório.

As amigas de Araçatuba, Carol e Mayra pela amizade e convivência e a Janaina pela amizade e discussões filosóficas sobre a reprodução animal.

A minha cunhadinha Vanessa que apesar de não estarmos sempre perto sempre me traz alegrias.

As minhas grandes amigas Paula, Páblia, Mariana e Renata que mesmo com a distância fazem parte de todas as alegrias e tristezas de minha vida, por serem pessoas especiais.

APOIO FINANCEIRO

Esse projeto foi financiado pela **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, sob processo nº2007/58577-8.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1.INTRODUÇÃO	01
1.1Objetivos.....	03
1.1.2 Objetivos específicos	03
1.2 Hipóteses.....	04
2. REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1. Maturação de oócitos.....	05
2.1.1. Maturação Nuclear.....	06
2.1.2. Maturação citoplasmática.....	07
2.1.2.1. Síntese de proteínas.....	07
2.1.2.2. Maturação molecular.....	08
2.1.2.3. Migração e redistribuição de organelas no citoplasma.....	12
2.2. Aumento da eficiência no cultivo de maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos.....	16
2.2.1. Meios de suplementos para cultivo de maturação <i>in vitro</i>	16
2.2.2. Inibidores da maturação <i>in vitro</i> de oócitos.....	19
2.3. Apoptose.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Obtenção e seleção dos oócitos.....	23
3.2. Bloqueio meiótico durante simulação de transporte.....	23
3.3. Maturação <i>in vitro</i>	24
3.4. Determinação do estágio da meiose (coloração com Hoechst 33342).....	24
3.5. Determinação da maturação citoplasmática.....	25
3.5.1. Coloração das mitocôndrias com JC-1.....	25
3.5.2. Coloração dos grânulos corticais com Lectina - <i>Lens culinaris</i>	27

3.6. Fertilização <i>in vitro</i>	28
3.7. Avaliação dos pró-núcleos.....	28
3.8. Cultivo de desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	29
3.9. Determinação do número de células e taxa de apoptose (coloração “Terminal Transferase Assay” – TUNEL).....	30
3.10. Delineamento experimental.....	31
3.10.1. Experimento 1 – Efeito de diferentes concentrações de butirolactona I sobre o bloqueio da meiose durante o transporte e sua reversibilidade.....	32
3.10.2. Experimento II – Efeito do bloqueio da meiose com butirolactona I durante o transporte sobre a maturação citoplasmática.....	33
3.10.3. Experimento III – Efeito do bloqueio da meiose com butirolactona I durante o transporte sobre a fecundação.....	33
3.10.4 Experimento IV- Efeito do bloqueio da meiose com butirolactona I durante o transporte sobre o desenvolvimento e qualidade embrionária.....	34
3.11. Análise estatística.....	34
4. RESULTADOS.....	35
4.1. Experimento I.....	35
4.2. Experimento II.....	37
4.3. Experimento III.....	45
4.4. Experimento IV.....	48
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES	61
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Estádio da meiose em oócitos submetidos ao bloqueio meiótico por 24 horas com butirolactona I e de oócitos maturados <i>in vitro</i> após remoção do meio contendo o bloqueador.....	36
Tabela 2 – Distribuição e potencial de membrana mitocondrial em oócitos submetidos ao bloqueio meiótico por 24 horas com butirolactona I e de oócitos maturados <i>in vitro</i> após remoção do meio contendo o bloqueador.....	38
Tabela 3 – Distribuição dos grânulos corticais em oócitos submetidos ao bloqueio meiótico por 24 horas com butirolactona I e de oócitos maturados <i>in vitro</i> após remoção do meio contendo o bloqueador.....	39
Tabela 4- Desenvolvimento de pró-núcleos em oócitos submetidos ao bloqueio meiótico com butirolactona I durante transporte simulado por 24 horas, seguido de cultivo de maturação e fecundação <i>in vitro</i>	46
Tabela 5 – Número de células totais e fragmentação nuclear estimada pelo ensaio TUNEL em blastocistos no D8 de cultivo, produzidos a partir de oócitos submetidos a bloqueio meiótico com 10 ou 100 mM de butirolactona I, seguido de maturação e fecundação <i>in vitro</i>	50

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Fotomicrografia das diversas fases da maturação nuclear de oócitos bovinos observados sob microscópio de epifluorescência	25
Figura 2 - Fotomicrografia da distribuição e do potencial das membranas mitocondriais de oócitos bovinos corados com iodeto de 5,5,6,6' – tetracloro - 1,1,3,3' – tetraetilbenzimidazolil-carbocianina (JC-1) e avaliados sob microscópio de epifluorescência.....	26
Figura 3 - Fotomicrografia da distribuição dos grânulos corticais de oócitos bovinos observados sob microscópio de epifluorescência	27
Figura 4 – Fotomicrografia de epifluorescência de oócitos 18 horas pós inseminação. A) oócito sem formação de PN (não fecundado). B) Oócito com a formação de 2 PN (fecundado). C) Oócito com formação de mais de 2 PN (polispermia).....	29
Figura 5. Fotomicrografia de epifluorescência de embriões 192hpi submetidos à técnica TUNEL.....	31
Figura 6. Esquema representativo do delineamento experimental.....	32
Figura 7. Associação entre maturação nuclear e distribuição citoplasmática das mitocôndrias em oócitos cultivados com butirolactona I durante 24 horas	41
Figura 8. Associação entre maturação nuclear e distribuição citoplasmática das mitocôndrias em oócitos cultivados com butirolactona I durante 24 horas, seguido de cultivo de maturação <i>in vitro</i> por 24 horas (controle) ou 20 horas (oócitos pré-cultivados com BI-I).....	42
Figura 9. Associação entre maturação nuclear e distribuição citoplasmática dos grânulos corticais em oócitos cultivados com butirolactona I durante 24 horas.....	43
Figura 10. Associação entre maturação nuclear e distribuição citoplasmática dos grânulos corticais em oócitos cultivados com butirolactona I durante 24 horas, seguido de cultivo de maturação <i>in vitro</i> por 24 horas (controle) ou 20 horas (oócitos pré-cultivados com BI-I).....	44
Figura 11. Formação de pró-núcleos 18 horas pós-inseminação de oócitos submetidos ao bloqueio meiótico com 10 ou 100 μ M de butirolactona I, seguido de maturação e fecundação <i>in vitro</i>	46

- Figura 12.** Correlação entre a porcentagem de oócitos que apresentaram fecundação normal (presença de 2 pró-núcleos) após 18 horas da inseminação e a porcentagem de oócitos com distribuição citoplasmática periférica (maturos) de grânulos corticais (GC) após a MIV..... 45
- Figura 13.** Correlação entre a porcentagem de oócitos que apresentaram formação de mais de 2 pró-núcleos (+2PN) após 18 horas da inseminação e a porcentagem de oócitos com distribuição dispersa (imaturos) de grânulos corticais (GC) após a MIV..... 45
- Figura 14.** Desenvolvimento embrionário *in vitro* de embriões produzidos a partir de oócitos submetidos a bloqueio meiótico com 10 ou 100 mM de butirolactona I, seguido de maturação e fecundação *in vitro*..... 47

LISTA DE ABREVIATURAS

μ M - micromolar;

AI - anáfase I;

AMPc - monofosfato de adenosina cíclica;

ATP - trifosfato de adenosina;

B199 - TCM-199, sais de Earle e 20 mM de bicarbonato de sódio;

BL I - butirolactona I;

BSA - albumina sérica bovina;

°C - Graus Celsius

CaMKII - calmodulina dependente de kinase II

CDK - cinase dependente de ciclina;

CIV - cultivo in vitro;

CO₂ - dióxido de carbono;

DAG – diacilglicerol;

DNA - ácido desoxirribonucléico;

EPM - Erro padrão da média;

ERK - cinase regulada por sinal extracelular (MAPK);

FITC - isotiocianato de fluoresceína;

FIV - fecundação in vitro;

GC- grânulos corticais;

GTP - guanosina trifosfato;

H199 - TCM -199, sais de Earle, 20 mM de bicarbonato de sódio e 25 mM de Hepes;

Hpi - horas pós-inseminação

IP₃ - inositol 1,4,5 triphosphate

LH - hormônio luteinizante;

MAPK - proteína cinase ativada por mitógenos;

MAP2K, MAP3K, MAP4K - cinases ativadoras de cinases ativadas por mitógenos

MEK - cinase regulada por sinal extracelular (MAP2K);

MI - metáfase I;

MII - metáfase II;

MIV - maturação in vitro;

ml - mililitro;

MPF - fator promotor da maturação;

Myt1, Wee1 e CDC25 - proteínas cinases envolvidas na atividade do MPF;

n - número

nm - nanômetro

OPU – ovum pick up – punção folicular guiada por ultra-som

pMol – picomol;

PBS - tampão fosfato salina;

PIV - produção in vitro;

PKA - proteína cinase A;

PKC - proteína cinase C;

PN – pró-núcleos;

PVA - álcool polivinílico;

RNAm - ácido ribonucléico mensageiro;

SAS - “Statistical analysis system”;

SB - solução de bloqueio

SFB – soro fetal bovino;

SOF – fluido de oviduto sintético;

TALP – meio tyrode’s com albumina, lactato e piruvato;

TCM-199 – meio de cultura de tecidos 199;

TI – telófase I;

VG – vesícula germinativa.

INIBIÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR PELA BUTIROLACTONA I DURANTE O TRANSPORTE DE OÓCITOS BOVINOS DESTINADOS À PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIV).

RESUMO - Butirolactona I (BI-I) pode ser utilizada em sistemas PIV de embriões para bloquear a meiose durante o transporte de oócitos obtidos de OPU. O objetivo deste estudo foi verificar a concentração de BL-I eficaz durante o transporte de oócito bovinos. Oócitos (n=4581) foram pré-maturados em criotubos contendo meio com 10 ou 100 μ M de BI-I, acrescido ou não de HEPES (20mM), no período de 5 horas em estufa portátil Minitub e transferidos para incubadora com atmosfera e temperatura controlada, permanecendo por mais 19 horas. Em seguida foram maturados a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ durante 20 horas, fecundados e os zigotos cultivados. Foram avaliadas a maturação nuclear e a maturação citoplasmática após pré-MIV e MIV (24h.-controles e 20h.-tratados). A fertilização foi avaliada após 18 h. da inseminação. Os embriões foram analisados quanto ao seu desenvolvimento e qualidade. Os dados foram avaliados por ANOVA (p<0,05). A maioria dos oócitos tratados permaneceu em GV e após MIV houve a reversão do bloqueio, mas a eficiência foi menor com 10 μ M de BI-I. A maturação citoplasmática foi beneficiada de acordo a distribuição das mitocôndrias, no entanto, quanto à distribuição dos grânulos corticais apenas o bloqueio realizado com 100 μ M BI-I permitiu uma maturação. A taxa de fecundação foi prejudicada pelo tempo de transporte, mesmo nos oócitos tratados. A ocorrência de polispermia foi correlacionada à porcentagem de oócitos com grânulos corticais imaturos. O desenvolvimento embrionário sofreu um atraso pela utilização de 100 μ M de BI-I, porém boa porcentagem de blastocistos de qualidade foi atingida. Assim, o bloqueio com 100 μ M de BI-I possui efeitos benéficos na PIV de embriões de oócitos transportados por longo tempo.

Palavras-chave: Butirolactona I, Fertilização *in vitro*, Grânulos Corticais, Maturação *in vitro*, Mitocôndria

INHIBITION OF THE NUCLEAR MATURATION BY BUTYROLACTONE I DURING THE TRANSPORT OF BOVINE OOCYTES FOR IN VITRO PRODUCTION OF EMBRYOS (IVP).

ABSTRACT - Butirolactone-I (BI-I), can be used in systems for in vitro production (IVP) of embryos to block meiosis during the transport of oocytes from OPU. The objective of this study is to assess the concentration of BI-I more efficient during the transport of bovine oocytes. Oocytes (n = 4581) were prematured in criotubes containing medium with 10 or 100 μ M of BI-I with or without HEPES (20mM) in a portable incubator at 38,5°C without CO₂ equilibration in the first 5 h, being later transferred to a incubator at 38.5°C and 5% CO₂ in humidified air during the 19 hours remaining. Following were matured, fertilized and the zygotes cultured at 38.5°C and 5% CO₂. Were evaluated the nuclear maturation and the cytoplasmic maturation after pre-IVM and after IVM (24h. controls and 20 h. treatments). Fertilization was assessed 18 hours after insemination. The embryos development and quality were analyzed. The data were evaluated by ANOVA (P< 0, 05). Most remained in GV oocytes treated and after IVM was the reversal of the blockage, but the efficiency was lower with 10 μ M of BI-I. The cytoplasmic maturation during the time of meiosis blockage was benefited from the distribution agreement and potential of mitochondria, however, about the distribution of cortical granules only blocking conducted with 100 μ M BI-I had a complete maturation. The rate of fertilization was damage by the time of transport, and the meiosis blockage with BI-I did not improve the percentage of fertilized oocytes. The occurrence of polyspermia was correlated with the percentage of oocytes with immature cortical granules. The embryo development was delayed by the use of 100 μ M of BI-I, but a good percentage of blastocysts of good quality reached. So, the use of 100 μ M of BI-I has beneficial effects on the IPV of embryos from oocytes transported at a long time.

Key-words: Butirolactone I, *In vitro* fertilization, *In vitro* maturation, Cortical Granules, Mitochondria

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões se consolidou e avançou rapidamente, sendo definitivamente incorporada aos programas comerciais de produção de embriões bovinos após o desenvolvimento de punção folicular (PF) guiada por ultra-som. A exploração destas biotécnicas abriu novos caminhos para multiplicação de animais de interesse econômico e permitiu a elevação dos índices de transferência de embrião, no que diz respeito ao número de bezerro/vaca/ano. Apesar dos muitos esforços para se melhorar a PIV de embriões bovinos para fins científicos e/ou comerciais, a sua eficiência ainda é relativamente baixa. Apenas 35-40% dos oócitos bovinos maturados (MIV), fecundados (FIV) e cultivados *in vitro* (CIV) desenvolvem-se até o estágio de blastocisto (MAYES e SIRARD, 2001; SIRARD et al., 2006) e, dentre estes, somente 30% chegam a termo após transferência para receptoras (WARD et al., 2002; PARK et al., 2005).

As baixas taxas são determinadas por causas distintas, tais como: fatores ambientais e inerentes ao próprio sistema de PIV de embriões, que atuam sobre todas as suas etapas (maturação, fecundação e cultivo); ou ainda a remoção do oócito do ambiente folicular, com conseqüente perda da interação morfológica, hormonal e molecular entre oócito e células foliculares. A soma destes fatores determina o prejuízo na qualidade e competência oocitária, levando à baixa produção de blastocistos, quando comparada àquela obtida *in vivo*.

Sabe-se que o folículo exerce ações capacitantes sobre o oócito, ações estas que são abolidas durante o processo de maturação *in vitro*. O oócito sofre significativas modulações quando está incluso no folículo dominante, especialmente em relação à sua ultra-estrutura e atividades funcionais (HYTTEL et al., 1997). Indubitavelmente, muitos fatores biológicos agem de forma conjunta para preparar o oócito imaturo para um desenvolvimento bem sucedido e um embrião competente depois da fecundação. Entre esses fatores destacamos a distribuição de organelas citoplasmáticas, como as

mitocôndrias e os grânulos corticais (STOJKOVIC et al., 2001; BREVINI et al., 2007). Defeitos na maturação oocitária podem possivelmente ser causados por uma inadequada maturação nuclear ou citoplasmática, ou mesmo por uma falha em ambas (YANG et al., 1998).

A maturação *in vitro* de oócitos é uma das fases mais importantes da PIV de embriões, pois é o período em que o oócito adquire capacidade de seguir os próximos eventos (FIV e CIV). Nesta fase, o oócito produz reservas bioquímicas que serão responsáveis pela manutenção do desenvolvimento inicial do embrião até a transição materno-zigótica (ativação dos genes do embrião). Ainda nesta fase, o oócito sintetiza enzimas que serão importantes para suportar o estresse oxidativo. Portanto, é durante esta fase de desenvolvimento que o oócito atinge sua capacidade plena e, devido a este fato, o termo “capacitação oocitária” foi sugerido (HYTTEL et al., 1997).

O bloqueio da meiose é uma importante ferramenta para que se possa estudar os possíveis fatores envolvidos na indução da “capacitação” após a remoção dos oócitos do ambiente folicular, e que podem ter efeitos positivos sobre o desenvolvimento embrionário subsequente. Inibidores de cinases dependentes de ciclinas (cdk), como a butirolactona I (KUBELCA et al., 2000, ADONA et al., 2008) e roscovitina (MERMILLOD et al. 2000), têm sido usados com sucesso para bloquear a meiose. Desta forma, a inibição reversível da meiose pela butirolactona I pode ser explorada usando-se sistema de cultura com pré-maturação com inibidor seguida de maturação, com o objetivo de aumentar a competência de desenvolvimento dos oócitos (PONDERATO et al., 2001).

Os bloqueadores da meiose podem ser também utilizados em situações práticas, como por exemplo em sistemas de PIV de embriões, com o intuito de se bloquear a meiose durante o transporte dos oócitos obtidos por PF guiada por ultra-som, já que geralmente o laboratório fica localizado a grandes distâncias da fazenda onde se encontram as doadoras de oócitos. Nesta situação, a utilização de bloqueadores da meiose pode ser duplamente importante: 1) como uma tentativa de se melhorar a “capacitação” oocitária durante o transporte; 2) na prevenção do envelhecimento do oócito durante o transporte, num processo anterior ao cultivo de maturação.

O estabelecimento de um sistema favorável à manutenção da qualidade do oócito bovino é essencial para se melhorarem os processos de produção de embriões *in vitro* quando os oócitos são obtidos em fazendas ou centrais de doadoras localizadas a grandes distâncias do laboratório. Com este intuito, este trabalho busca acrescentar informações referentes às necessidades metabólicas ou fisiológicas para a adequada capacitação e maturação do oócito e, baseado nestas necessidades, definir um sistema de cultivo que aumente a produção *in vitro* de embriões bovinos.

1.2 OBJETIVOS

Com o intuito de melhorar os resultados da produção *in vitro* de embriões, este trabalho teve por objetivo principal avaliar os efeitos da suplementação do meio de pré-maturação com diferentes concentrações de Butirolactona I por 24 horas sobre o bloqueio da maturação nuclear de oócitos, sobre a subsequente maturação/capacitação do oócito, momento da fecundação, competência no desenvolvimento e qualidade de embriões bovinos.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a eficácia da butirolactona I em diferentes concentrações como inibidor da maturação nuclear durante transporte simulado (cultivo de pré-maturação) por 24 horas.
2. Avaliar o efeito da suplementação do meio de pré-maturação com HEPES, sobre a competência oocitária, maturação nuclear, fecundação e competência do desenvolvimento embrionário *in vitro*.
3. Relacionar a competência oocitária e a fase da meiose nos tempos de 0, 20 e 24 horas do início do cultivo de maturação do oócito bovino.
4. Verificar a competência no desenvolvimento embrionário *in vitro* após a fecundação de oócitos previamente submetidos à retardo da maturação nuclear com suplementação de butirolactona I no meio pré-maturação por 24 horas.
5. Estabelecer correlações entre danos no DNA e taxa de maturação, fecundação e de desenvolvimento de embriões até o estágio de blastocisto.

1.3 HIPÓTESES

1. A inibição da maturação nuclear pela butirolactona I viabiliza o transporte de oócitos por tempos prolongados, pois impede a degeneração e, conseqüentemente, permite a competência final dos mesmos.
2. A sincronização da maturação nuclear e citoplasmática com o uso do inibidor da maturação nuclear butirolactona I aumenta a qualidade de oócitos e, conseqüentemente, a produção de blastocistos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MATURAÇÃO DE OÓCITOS

O processo de maturação inclui todos os eventos que permitem ao oócito expressar seu potencial máximo de desenvolvimento após a fecundação. Neste sentido, é uma das fases mais importantes da PIV de embriões, pois é neste período em que o oócito adquire capacidade para prosseguir nos próximos eventos (FIV e CIV).

Durante a maturação, os oócitos passam por várias alterações nucleares e citoplasmáticas. Os eventos nucleares incluem: quebra da vesícula germinativa (GBVD), desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico (MEINECKE et al., 2001). Os eventos citoplasmáticos incluem: síntese de proteínas (SIRARD et al., 1998), modificações moleculares (KUBELKA et al., 2000), redistribuição das organelas intracelulares (STOJKOVIC et al., 2001) e maturação dos mecanismos de liberação do Ca^{2+} (WANG et al., 2003). As transformações estruturais são acompanhadas por uma série de atividades bioquímicas estabelecidas por uma complexa cascata de fosforilações e desfosforilações de proteínas envolvidas no reinício e na regulação da meiose (DE SOUSA et al., 2004; DEKEL, 2005; DUMONT et al., 2005). Entre as proteínas que mais se destacam no período da maturação estão as proteínas do complexo MPF (fator promotor da maturação) e da família MAPK (proteína cinase ativada por mitógenos). Desta forma, vários fatores atuam de maneira a tornar o oócito imaturo hábil à fecundação e desenvolvimento de um embrião viável.

Apesar de sua complexidade, a maturação oocitária pode ser realizada *in vitro* após a remoção do oócito imaturo do folículo e cultivo em meio e ambiente adequados (EDWARDS, 1965). No procedimento *in vitro*, os oócitos retornam à maturação meiótica quando são removidos do folículo e cultivados em meio adequado (GORDON, 1994).

Por outro lado, *in vivo*, é durante a fase de desenvolvimento folicular que o oócito adquire a competência para o posterior desenvolvimento (LONERGAN et al., 2003). A maturação inadequada do oócito, seja do núcleo ou do citoplasma, inviabiliza a fecundação e aumenta a ocorrência de polispermia, partenogênese e bloqueio do desenvolvimento embrionário (XU e BRACKETT, 1988)

2.1.1. Maturação Nuclear

A maturação nuclear refere-se à progressão da meiose a partir do estágio dictioto (diplóteno da prófase da primeira meiose - prófase I) até a fase de metáfase II (M II) (MINGOTI et al., 1995).

In vivo, oócitos adquirem a competência meiótica durante sua fase de crescimento, e isto ocorre simultaneamente ao desenvolvimento folicular. Os oócitos são mantidos no estágio de vesícula germinativa (GV) no ambiente folicular até que ocorra o pico pré-ovulatório de gonadotrofinas, o que estimula a maturação do oócito e induz alterações fisiológicas na atividade das células do *cumulus* (FAIR, 2003; RODRIGUEZ e FARIN, 2004). Sob a influência dos hormônios gonadotróficos, o oócito recomeça o ciclo celular a partir da fase de diplóteno da prófase I (estádio dictioto), passa pelos estádios de metáfase I, anáfase I, telófase I (término da primeira divisão meiótica) e progride até o estágio de metáfase da segunda divisão meiótica (MEINECKE et al., 2001). No intervalo que compreende os estádios de prófase I a metáfase II, os cromossomos se condensam e o envelope nuclear é desfeito (GVBD), marcando o início da maturação nuclear (MEINECKE et al., 2001; JONES, 2004). Na seqüência, os cromossomos homólogos são divididos em dois grupos, sendo que metade do número original de cromossomos permanece no oócito (célula haplóide) e a outra metade é incorporada ao primeiro corpúsculo polar. Ao término da primeira divisão meiótica, o citoplasma é dividido assimetricamente (CAN et al., 2003), gerando duas células de tamanhos diferentes: uma pequena chamada de corpúsculo polar e outra maior, o oócito secundário. Após a maturação nuclear, o oócito permanece nesse estágio do ciclo celular (M II) até a fecundação (MAYES e SIRARD, 2001).

Os fatores da ativação dos oócitos maduros (natural – pela fecundação, ou artificial – através de drogas) vão promover o término da segunda divisão meiótica, que se caracteriza pela progressão da M II até a fase de telófase II e extrusão do segundo corpúsculo polar. Após a ativação, o zigoto continua seu desenvolvimento por divisão mitótica.

2.1.2. Maturação citoplasmática

As alterações metabólicas que ocorrem durante a maturação citoplasmática do oócito são processos altamente complexos que envolvem vários eventos simultâneos, como síntese de proteínas (SIRARD et al., 1998), modificações moleculares (KUBELKA et al., 2000) e migração e reorganização de organelas no citoplasma (STOJKOVIC et al., 2001).

2.1.2.1. Síntese de proteínas

In vivo, a maturação do citoplasma em oócitos é adquirida após uma série de processos preparatórios que envolvem a transcrição e conseqüente tradução de transcritos durante a prófase meiótica (HYTTEL et al., 1997). A maioria dos RNAm (ácido ribonucléico mensageiro) presentes no oócito é sintetizada e acumulada durante o período de crescimento oocitário (DE SOUSA et al., 1998). Isto ocorre porque a retomada da meiose envolve a condensação dos cromossomos, o que resulta em um súbito bloqueio da transcrição nuclear e em profundas modificações no padrão de neossíntese protéica (WU et al., 1996; LONERGAN et al., 1997). Assim, até que a transcrição do DNA do embrião se torne ativa (o que ocorre após a transição materno-zigótica), o desenvolvimento do oócito, zigoto e embrião de menos de 16 células dependem do “pool” de RNAm e das proteínas acumuladas para suportar todas as modificações bioquímicas, moleculares e estruturais do oócito que ocorrem durante a maturação (DE LA FUENTE e EPPIG, 2001; GANDOLFI e GANDOLFI, 2001; LONERGAN et al., 2003).

Marcantes alterações na síntese e fosforilação de proteínas são observadas no oócito bovino (MOTLIK et al., 1990) e tem papel de ordenar a seqüência de eventos que culminam com a maturação oocitária (WU et al., 1996; KHATIR et al., 1998). Durante a progressão da meiose durante a MIV de oócitos bovinos observa-se quatro fases de síntese protéica: proteínas necessárias para GVBD; para progressão até M I; para progressão até M II; e, finalmente, para manutenção em M II (SIRARD et al., 1989). Como exemplo, uma proteína de 28 kDa presente no oócito entre 0 e 8 horas de cultivo parece estar envolvida na transição do estágio de GVBD para M I. Após 4 a 20 horas de cultivo há o aparecimento de uma proteína de 48 kDa, cuja síntese cai novamente após 20 horas de cultivo. Outra proteína de 67 kDa, cuja síntese aumenta por volta de 16 horas de cultivo, parece influenciar a progressão da meiose até a fase de M II. Ao final da maturação de oócitos bovinos, há ainda a diminuição de uma proteína de 45 kDa (KHATIR et al., 1998) identificada como actina, que é um dos maiores produtos sintetizados pelo oócito imaturo (SCHRODER et al., 1995). A diminuição da síntese desta proteína parece ser uma característica essencial do processo normal de maturação (LE GAL et al., 1992).

2.1.2.2. Maturação Molecular

Durante a maturação citoplasmática, um aumento pronunciado na atividade das cinases inicia uma complexa cascata de fosforilação e desfosforilação de proteína específica. As cinases dependentes de ciclinas (CDKs), são uma família de serina/treonina cinases envolvidas na regulação do ciclo celular (CDK1, 2, 3, 4, 6 e 7), na transcrição (CDK7, 8 e 9) ou na função neuronal (CDK5) (SCHANG, 2004; MAPELLI et al., 2005). A atividade da CDK é dependente da interação com uma ciclina, cujos níveis são regulados seqüencialmente para assegurar que as fases do ciclo celular prossigam na ordem correta (ARRIS et al., 2000). Exemplos importantes de cinases são o fator promotor de maturação (MPF) e a família da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) (MOTLIK et al., 1998). Os oócitos em crescimento desenvolvem primeiramente a habilidade de ativar o MPF e, posteriormente, de ativar a via MAPK.

Somente os oócitos com o crescimento completo possuem competência para ativar efetivamente as duas vias do ciclo celular.

Inibidor de Maturação Oocitária

Complexos *cumulus*-oócito (COCs) removidos de folículos antrais e cultivados *in vitro* retomam a meiose espontaneamente, mesmo na completa ausência de hormônios (PINCUS e ENZMANN, 1935), provavelmente pela simples remoção de algum fator inibitório presente no folículo íntegro. Foi sugerido que um dos fatores que impedem o oócito de sofrer maturação meiótica espontânea *in vivo* é o inibidor da maturação oocitária (OMI), um polipeptídeo encontrado no fluido folicular de ovários de uma variedade de mamíferos (WASSARMAN e ALBERTINI, 1994). Estudos sugerem que o OMI seja produzido pelas células foliculares, seja teca e/ou granulosa (SIRARD et al., 1998). KOTSUJI et al. (1994) demonstraram que o fator inibidor da meiose em oócitos bovinos é sintetizado pelas células da granulosa, mas que as células da teca contribuem na amplificação desse sinal.

Monofosfato de Adenosina cíclica (AMPc)

O mecanismo que envolve o reinício da meiose também está associado à redução das concentrações de AMPc (CONTI et al., 1998). O AMPc é uma molécula sinalizadora intracelular que exerce um importante controle na meiose em mamíferos, anfíbios e em alguns invertebrados (BILODEAU-GOESEELS, 2003). A redução do AMPc no interior do oócito parece estar envolvida com a ruptura da vesícula germinativa, ao menos *in vitro*. Assim, os níveis elevados do AMPc dentro do oócito mantêm o bloqueio meiótico, visto que a redução do AMPc é um sinal necessário para a maturação oocitária (CONTI et al., 1998; EYERS et al., 2005).

Fator Promotor de Maturação (MPF)

O MPF é uma cinase envolvida na divisão celular e na regulação do ciclo de transição da célula G2/M de todas as células eucarióticas. É um dos principais reguladores das alterações que ocorrem durante a maturação oocitária, regulando a

condensação dos cromossomos, o rompimento do envelope nuclear, a reorganização dos microtúbulos e outras organelas citoplasmáticas (KIM et al., 2000; KANO et al., 2000; KRISCHEK e MEINECKE, 2002; LEFEBVRE et al., 2002).

A ativação do MPF é também um ponto chave da retomada da meiose em oócitos, que corresponde à transição da G2/M (EPPIG et al., 1996). Esta ativação é um processo “two-steps” que envolve a formação de um complexo entre a subunidade da cinase (p34^{cdc2} ou CDK1) e uma subunidade regulatória (ciclina B). Uma vez formado, esse complexo pode ser ativado pela desfosforilação da treonina 14 e resíduos da tirosina 15 da subunidade p34. Assim, em bovinos, a atividade do MPF requer tanto a neossíntese protéica como as cascatas de fosforilação/desfosforilação. A estabilidade da atividade do MPF pode ser prevenida por drogas que agem nesses dois níveis (MERMILLOD et al., 2000).

A variação da atividade do MPF pode ser detectada nos oócitos bovinos durante a maturação. Sua atividade é baixa no estágio de GV, passando a ser observada no início da GVBD. Alcança um pico em M I, declina sua atividade durante a transição entre os estádios de M I e M II (KUBELKA et al., 2000), e eleva-se novamente para entrada do oócito em M II. Sua inativação nos oócitos em estágio de M II é induzida pela fecundação ou pela ativação paternogenética (KUBELKA et al., 2000; KIKUCHI et al., 2000; ABRIEU et al., 2001; LEDAN et al., 2001).

O processo de desorganização do heterodímero do complexo MPF independe da sua ativação catalítica, que é causada geralmente pela proteólise da ciclina B. Em oócitos fecundados de camundongos e de suínos, a degradação da ciclina B foi claramente relacionada com a inativação do complexo MPF (KIKUCHI et al., 1999).

Proteína Cinase Ativada por Mitógenos (MAPKs)

Outro grupo de proteínas que estão envolvidas na progressão da meiose são as MAPKs, pertencentes à família das serina/treonina cinases (KUBELKA et al., 2000). Essas proteínas são ativadas por sinais extracelulares e, por esta razão, a MAPK também é chamada de ERK (cinase regulada por sinal extracelular – suas variantes, ERK1/2 – p44/p42 kDa) (NEBREDA e FERBY, 2000; KRISCHEK e MEINECKE, 2002).

A ampla faixa de atuação das MAPKs é mediada por fatores de crescimento e por soro, com uma ativação menor pelo estresse, efeito osmótico e pela desorganização dos microtúbulos. Assim, também está relacionada a fosforilação de diversos substratos, incluindo fosfolipases, fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto. As MAPKs também catalisam fosforilação e a ativação de diversas proteínas cinases, denominadas de proteínas cinases ativadas pelas MAPKs, que representam um adicional enzimático de vários espectros em diferentes células (ROUX e BLENIS, 2004).

A via MAPK é ativada universalmente durante a maturação meiótica em oócitos de vertebrados. A ativação da MAPK em oócitos bovinos ocorre após 8 horas de cultivo *in vitro* e apresenta um aumento gradual até 12–14 horas e se mantém estável até o final da maturação (KUBELKA *et al.*, 2000). As duas principais isoformas (ERK1/2) da MAPK são ativadas com a proximidade do rompimento da VG em oócito bovinos (KUBELKA *et al.*, 2000). Isso sugere que a MAPK não é requerida para o reinício da meiose, mas é essencial em eventos pós-rompimento da VG (KANO *et al.*, 2000; LEFEBVRE *et al.*, 2002). Porém, a injeção de MAPK ativa em oócitos de suíno ou de bovino induz o rompimento da VG, indicando que essa proteína promove o reinício da meiose em condições especiais (INOUE *et al.*, 1998).

Há evidências de que as proteínas da família MAPK (proteína cinase ativada por mitógenos) e a PKC (proteína cinase C) são responsáveis pela estabilidade dos microtúbulos mantendo o fuso meiótico estável em oócitos de ratos (HORNE *et al.*, 2003; TONG *et al.*, 2003).

Trifosfato de Adenosina (ATP)

Sabe-se que o ATP é necessário para viabilizar várias funções celulares incluindo motilidade, manutenção da homeostasia e regulação da sobrevivência celular. A função do ATP na aquisição da competência meiótica do oócito foi analisada em muitas espécies, como por exemplo bovinos (STOJKOVIC *et al.*, 2001) e camundongos (VAN BLERKOM *et al.*, 1995). STOJKOVIC *et al.* (2001) demonstraram que o nível de

ATP após MIV é maior em oócitos de melhor classificação morfológica do que naqueles pobremente classificados.

Trabalhos anteriores descrevem um significativo aumento progressivo do nível de ATP em oócitos do começo (estágio de GV) até o final (M II) da MIV (STOJKOVIC et al., 2001; BREVINI et al., 2007). Outros trabalhos associam a maior taxa de produção de embriões com grandes concentrações de ATP (STOJKOVIC et al., 2001; VAN BLERKOM et al., 1995), indicando que o nível de ATP é responsável pela capacidade de desenvolvimento embrionário após a FIV.

No entanto, o valor exato da concentração de ATP no oócito foi caracterizado apenas em humanos, onde foi encontrada a necessidade de uma concentração maior que 2 pmol ATP/oócito para suportar um bom desenvolvimento embrionário até a implantação (VAN BLERKOM, et al. 1995).

2.1.2.3. Migração e redistribuição de organelas no citoplasma

A migração e reorganização de organelas durante a maturação citoplasmática é coordenada por uma rede de microtúbulos. Organelas citoplasmáticas como as mitocôndrias e os grânulos corticais exercem importantes funções durante a maturação e fecundação do oócito. Devido a isso, durante a maturação, estas organelas migram e posicionam-se no citoplasma em locais mais apropriados para iniciar suas atividades específicas.

Microtúbulos

Microtúbulos são filamentos altamente dinâmicos, já que constantemente ocorre a adição (polimerização) ou remoção (despolimerização) de novas unidades de tubulina α e β . Os microtúbulos estão envolvidos na manutenção da forma celular e na movimentação de moléculas e organelas celulares. Durante a maturação de oócitos de mamíferos, os centrossomos são responsáveis pela regulação coordenada da intensa reorganização dos microtúbulos durante os eventos nucleares e citoplasmáticos (KIM et al., 2000; CAN et al., 2003; SUN et al., 2004).

Duas populações de microtúbulos foram identificadas em ratos: uma está ligada ao rearranjo e conformação do DNA e outra está restrita ao citoplasma. Durante a MIV de oócitos bovinos, é formada uma rede de microtúbulos somente próxima ao DNA condensado e não é detectada no citoplasma (KIM et al., 2000). Já em oócitos suínos, uma rede de microtúbulos aparece no citoplasma entre 24-28 horas de MIV, mas no final da maturação não é mais visualizada.

A translocação de organelas, proteínas e RNAm para áreas específicas dentro do citoplasma requer a presença da rede de microtúbulos, mas também de proteínas motoras, como as cinesinas (COHEN, 2002) que transportam moléculas através da célula por movimento ao longo dos microtúbulos, acompanhando os microtúbulos durante a maturação de oócitos suínos (BREVINI et al., 2007).

A rede de microtúbulos e as proteínas cinesinas não foram verificadas durante a maturação de oócitos suínos com baixa competência de desenvolvimento (BREVINI et al., 2007). Assim, pode-se suspeitar que essa ausência leva a uma maturação citoplasmática incompleta e reflete em uma alteração da compartimentalização do ooplasma e na distribuição de organelas como as mitocôndrias e grânulos corticais. Portanto, a rede de microtúbulos deve estar relacionada a habilidade do oócito suportar o desenvolvimento do embrião.

Redistribuição de mitocôndrias e potencial de membrana mitocondrial

As mitocôndrias são a central bioenergética da célula, com função claramente essencial que define a competência funcional dos oócitos. São organelas especializadas que ocupam uma porção substancial do volume citoplasmático das células de origem materna. As mitocôndrias são responsáveis pela produção da maior parte da energia celular em forma de ATP por fosforilação oxidativa através do metabolismo dos carboidratos e dos ácidos graxos contidos no citoplasma (WILDING et al., 2001; CUMMINS, 2004). Nos oócitos em geral, há uma grande concentração de mitocôndrias para suportar uma taxa mais elevada de síntese de moléculas dos processos fisiológicos envolvidos no desenvolvimento. A eficiência da matriz mitocondrial na conversão do piruvato em ATP é requerida para o processo de

maturação e divisão celular (WILDING et al., 2001). A inabilidade das mitocôndrias de aumentarem e/ou acumularem ATP tem sido ligada ao desenvolvimento anormal ou ao bloqueio do desenvolvimento embrionário (STEUERWALD et al., 2000).

Durante a mitose, as mitocôndrias são distribuídas aleatoriamente entre as células filhas. No decorrer da oogênese há um aumento substancial no número de mitocôndrias (6.000 para 193.000 mitocôndrias no oócito em humanos) com uma variação expressiva entre oócitos do mesmo estágio de desenvolvimento (REYNIER et al., 2001; CUMMINS, 2004). Porém, se os blastômeros embrionários não receberem uma população suficiente de mitocôndrias para produção de ATP, podem tornar-se disfuncionais e fragmentados (CUMMINS, 2004). Há uma correlação similar entre o potencial para o desenvolvimento, índice de ATP e função mitocondrial tanto nos oócitos quanto nos embriões bovinos (STOJKOVIC et al., 2001).

O metabolismo das mitocôndrias tem sido caracterizado por distintos padrões de distribuição desta organela, bem como pelo potencial de suas membranas em diferentes estágios da maturação oocitária e no desenvolvimento embrionário. No entanto, padrões ainda são incertos no desenvolvimento oocitário e embrionário de várias espécies (CUMMINS et al., 2004; TARAZONA et al., 2006).

A membrana interna da mitocôndria atua como um sistema polarizado internamente, com cargas negativas que funcionam como sítio de ligação para corantes lipofílicos para determinar o potencial de membrana mitocondrial. Vários estudos têm usado corantes lipofílicos fluorescentes como 5,5',6,6',-Tetracloro-1,1',3,3'-tertratilbenzimidazol iodeto de carbocianina (JC-1) para determinar a correlação existente entre um bom desenvolvimento oocitário e embrionário com a atividade metabólica da mitocôndria (WILDING et al., 2001; VAN BLERKOM et al., 2002; TARAZONA et al., 2006). O JC-1 é um corante catiônico lipofílico que entra na membrana interna da matriz em forma monomérica quando a mesma está polarizada (REERS et al., 1995). Quando há um alto potencial de membrana mitocondrial, o corante atravessa a membrana e formam agregados que se excitam com comprimento de onda de 535 nm e emitem fluorescência vermelha sob a exposição de luz UV (590nm). Se o potencial da membrana for baixo, o corante permanece em sua forma

monomérica e apresenta excitação sob 485 nm, emitindo fluorescência verde (525 nm). Assim a coloração com JC-1 permite analisar a distribuição das mitocôndrias e o potencial de membrana mitocondrial.

A distribuição das mitocôndrias durante a maturação está bem caracterizada em oócitos de mamíferos. Em estágio de GV, as mitocôndrias são encontradas predominantemente na periferia do citoplasma, e com pequenos grupos dispersos mais ao centro do ovócito (HYTTEL et al., 1997; SUN et al., 2001; ADONA et al., 2008). Em oócitos em estágio de M II, as mitocôndrias ocupam posição mais centralizada no citoplasma (HYTTEL et al., 1997; SUN et al., 2001; ADONA et al., 2008).

Redistribuição dos Grânulos Corticais

Os grânulos corticais (GC) presentes no citoplasma do oócito são vesículas secretoras não renováveis, pois seu conteúdo não é mais sintetizado após a liberação promovida pela penetração do espermatozóide. Produzidos a partir do complexo de Golgi, estão presentes apenas nos gametas femininos de todos os mamíferos, na maioria dos vertebrados e em muitos invertebrados (WESSEL et al., 2001). Seu conteúdo é constituído de uma população de moléculas que inclui proteases, glicosidases, enzimas e proteínas estruturais que contribuem na modificação da matriz extracelular (zona pelúcida) existente nos oócitos para oferecer uma barreira física e bioquímica para o bloqueio da polispermia (WESSEL et al., 2001).

Os GC são formados nos oócitos em crescimento, mas sua redistribuição ocorre no período da maturação (HYTTEL et al., 1997). Inicialmente, os GC podem ser identificados em pequenos grupos ("clusters") pelo citoplasma dos oócitos em estágio de GV. Sua migração para a periferia do oócito ocorre durante o avanço da maturação. Quando o oócito atinge o estágio de M II, os GC estão distribuídos no córtex, próximos à membrana plasmática (WESSEL et al., 2001; VELILLA et al., 2004, ADONA et al., 2008). A lecitina - *Lens- culinaris* é utilizada para observar a dinâmica dos grânulos corticais por ser uma aglutinina ligada a FITIC que se liga especificamente à α -D-manose presentes nos grânulos corticais.

Uma cascata de sinais desenvolvidos durante a maturação é responsável pela exocitose dos grânulos corticais, denominada reação cortical (SUN, 2003). Estudos têm sugerido que a exocitose do GC está ligada à proteínas dependentes de cálcio (ABBOTT e DUCIBELLA, 2001) e à transição de cálcio do meio extracelular para o meio intracelular que ocorre com a fusão espermatozóide-oócito (WANG *et al.*, 2003). Entre as proteínas que atuam como receptores e segundo-mensageiros nessa cascata, destacam-se o inositol 1,4,5 triphosphate (IP₃), a proteína kinase C (PKC), o diacilglicerol (DAG) e a proteína G (WU *et al.*, 1996). Outros fatores, como a calmodulina dependente de kinase II (CaMKII) e o número de retículo endoplasmático cortical, os quais são cogitados como estoques de cálcio em oócito maturo, também estão diretamente envolvidos (ABBOTT e DUCIBELLA, 2001).

2.2. AUMENTO DA EFICIÊNCIA NO CULTIVO DE MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

Atualmente, as pesquisas realizadas com o objetivo de se aumentar a eficiência do desenvolvimento de oócitos cultivados *in vitro* têm recebido dois principais enfoques: a adição de substâncias promotoras de crescimento ao meio de maturação; e a tentativa de simulação das condições intrafoliculares, mantendo-se os oócitos em bloqueio meiótico com inibidores de maturação nuclear, numa tentativa de proporcionar mais tempo para aquisição da capacitação do oócito.

2.2.1. Meios e suplementos para cultivo de maturação *in vitro*

Nutrientes, atmosfera, osmolaridade e pH são fatores que devem ser bem controlados durante o cultivo *in vitro*, tentando sempre seguir as características mais próximas possíveis do ambiente folicular *in vivo*.

O meio mais utilizado na MIV de oócitos bovinos é o tissue culture medium 199 (TCM-199), existindo poucos relatos que sugerem que outro meio possa ser mais apropriado (GORDON, 1994). Este meio é constituído por uma fórmula complexa, originalmente designada para as necessidades metabólicas de célula somáticas,

particularmente de linhagens celulares. Desta forma, este meio não é específico para suprir as necessidades complexas e dinâmicas de COCs durante o cultivo de maturação. Esta é uma das principais deficiências na tecnologia da MIV de oócitos, o que leva muitos pesquisadores a realizarem extensas investigações na formulação de meios específicos para esta finalidade, bem como a inclusão de aditivos e suplementos para melhoria do meio e, conseqüentemente, da qualidade dos oócitos cultivados em sistemas *in vitro*.

Soro e albumina sérica bovina (BSA) são fontes protéicas mais comumente utilizadas como suplemento do meio de cultura para PIV bovinos (MINGOTI et al., 2002). Vários estudos demonstraram a desvantagem da utilização de fontes de origem animal nos meios de PIV, pois esses podem ser veículos para agentes infecciosos e tóxicos para o embrião. Ainda entre outras desvantagens, observa-se que geralmente embriões cultivados com soro ou BSA acumulam lipídeos, o que aumenta a sensibilidade à criopreservação. Devido a esses fatores, muitos estudos indicam a utilização de meios quimicamente definidos, os quais não têm as desvantagens do soro, mas infelizmente produzem baixas taxas de blastocistos viáveis (GILCHRIST E THNPSON, 2007).

Os hormônios LH e FSH adicionados no meio de maturação promovem uma melhora na expansão das células do *cumulus oophorus* (YOUNIS e BRACKETT, 1992). O FSH estimula a produção de substâncias sinalizadoras pelas células somáticas, que induzem a retomada da meiose, estimulam a expansão do *cumulus* e, portanto, facilitam a fertilização.

O pH das soluções e do fluido celular é crítico para a eficiência de muitos eventos e reações bioquímicas que envolvem o equilíbrio ácido-básico e, devido a isto, influencia a produção de blastocistos. O uso de sistemas tampões em meio de cultivo é necessário para minimizar possíveis variações do pH do meio, que deve permanecer entre 7,3 e 7,5 durante a maturação de oócitos e o cultivo embrionário. Variações de pH no meio de cultivo, dependendo da amplitude, podem resultar em diminuição dos índices de fecundação e produção de blastocistos, já que a viabilidade celular é afetada. O sistema tampão empregado na MIV irá depender se o meio é exposto ao ar

atmosférico ou a uma atmosfera controlada. Geralmente a maturação *in vitro* é realizada em 5% CO₂ em ar atmosférico, utilizando-se meio tamponado com bicarbonato de sódio para manutenção do pH em 7,4 sob estas condições. Por outro lado, quando oócitos ou embriões são manipulados em ar atmosférico, a utilização do HEPES N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-ethanesulphonic acid) mantém o pH de maneira eficiente e mais constante do que a utilização única de bicarbonato. O HEPES foi desenvolvido por GOOD et al. (1966) e trata-se de um tampão orgânico para pesquisas biológicas. Por possuir as características de ter máxima solubilidade em água, dificuldade para passar para a membrana celular, não formar complexos com substâncias biológicas, possuir baixa toxicidade, ser estável e não agir como inibidor em reações bioquímicas, é o sistema tampão orgânico mais utilizado para o cultivo de tecidos e células animais.

Quando utilizado por curto período de tempo, a utilização do HEPES pode ser vantajosa, especialmente quando se trabalha com oócitos e embriões expostos ao ar atmosférico. Sua utilização é particularmente vantajosa em algumas situações, como por exemplo na exploração comercial da PIV onde os oócitos são obtidos por punção folicular guiada por ultra-som em animais vivos (OPU). Neste procedimento, muitas vezes oócitos são aspirados em locais distantes dos laboratórios de PIV e, nestes casos, o transporte dos oócitos é realizado em estufa portátil em atmosfera ambiente (sem controle de CO₂) à 38,5°C. Por outro lado, estudos recentes mostram que o HEPES pode diminuir o pH intracelular ou levar a uma diferença de incorporação de substratos carbono no RNA e/ou DNA e, assim, pode causar uma alteração no desenvolvimento da competência dos oócitos preservados (HASHIMOTO et al., 2003). Sabe-se ainda que o HEPES pode ser tóxico e causar fragmentação de células nas primeiras divisões do embrião, por isso muitos meios livres de HEPES são usados para manipulação de oócitos e embriões em ar atmosférico, preferindo-se o uso de bicarbonato (IWASAKI et al., 1999; MORGIA et al., 2006).

Por fim, vários estudos têm indicado a suplementação do meio de MIV com fatores de crescimento recentemente estudados, como o fator de crescimento de diferenciação 9 (GDF-9), fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), Kit

ligando (KL), fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), dentre outros. Cada um desses fatores está ligado ao crescimento celular, desenvolvimento de mensageiros bioquímicos e receptores que se completam para a aquisição da competência final do oócito e, finalmente, para a melhora da PIV de embriões.

2.2.2. Inibidores da maturação *in vitro* de oócitos

In vivo, oócitos passam por várias modificações moleculares e estruturais (capacitação) antes de completar a maturação. *In vitro*, a retomada da meiose ocorre repentina e espontaneamente, independente da competência adquirida. Assim, alguns oócitos reassumem a meiose sem adquirir plena capacitação (ADONA e LEAL, 2006; GILCHRIST e THOMPSON, 2007).

A maturação nuclear espontânea que ocorre em oócitos cultivados *in vitro* pode ser prevenida tentando-se manter o oócito em meiose estacionária e, assim, pode-se permitir que o desenvolvimento do ooplasma (incluindo a maturação citoplasmática) e aquisição da capacitação ocorram de maneira mais semelhante àquela observada *in vivo* (GILCHRIST e THOMPSON, 2007). Além disso, o bloqueio da meiose é uma importante ferramenta para que se possam estudar os possíveis fatores envolvidos na indução da “capacitação” após a remoção dos oócitos do ambiente folicular, já que a maturação nuclear do oócito não é suficiente para resultar no subsequente desenvolvimento embrionário. Todavia, convém ressaltar que nesse tipo de estudo é importante verificar não só a efetividade das substâncias em inibir o reinício da meiose, mas também sua eficiência na reversibilidade e ausência de efeitos negativos sobre o desenvolvimento embrionário.

O bloqueio da meiose pode ser obtido com o uso de estabilização farmacológica ou com inibidores fisiológicos (células da teca) (KUBELKA et al., 2000; MERMILLOD et al., 2000). Os diferentes tipos de inibidores farmacológicos atuam de modos distintos: podem manter altas concentrações de AMPc no interior do oócito, como a 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (BILODEAU-GOESEELS, 2003); podem inibir a síntese protéica de maneira não específica, como a cicloheximidine (MEINECKE et al., 2001); podem

inibir proteínas cinases, como a dimethylaminopurine (6-DMAP) (ANDERIESZ et al., 2000; DODE e ADONA, 2001); e, ainda, podem inibir especificamente a fosforilação de proteínas CDKs, como a roscovitina e butirolactona I (ADONA e LEAL, 2004, BARRETTO et al., 2007).

Dentre todas as drogas que podem ser utilizadas para o bloqueio da meiose, a butirolactona I demonstrou ser a mais segura e eficiente. Butirolactona I é um inibidor natural isolado do fungo *Aspergillus terreus*, que exibe atividade antiproliferativa, inibindo seletivamente em mamíferos as cinases CDK2 e CDK1, que executam um importante papel na progressão do ciclo celular nas fases G1/S e G2/M, respectivamente (SCHIMMEL et al., 1998; SCHANG, 2004). Entretanto, tem pouco efeito nas proteínas cinases ativadas por mitógenos, proteína cinase C, cinases dependentes de AMPc, caseína cinase I e II e no receptor tirosina cinase do fator de crescimento epidermal (SCHIMMEL et al., 1998; SAX et al., 2002; BRAÑA et al., 2004). Recentemente, KUBELKA et al. (2000), demonstraram que a butirolactona I na concentração de 100 μ M pode manter a meiose estacionada em bovinos por 24 a 28 horas. Todavia, recentes estudos demonstraram que oócitos bovinos podem ter a meiose bloqueada de forma eficaz e reversível utilizando-se baixas concentrações de butirolactona I (10 μ M), desde que seja utilizada em meio sem macromoléculas (ADONA e LEAL, 2006).

2.3. APOPTOSE

A apoptose é a forma mais generalizada de morte celular, pois ocorre tanto no desenvolvimento embrionário-fetal como ao longo da vida adulta (KERR e SEARLE, 1972). A morte celular programada, tanto no desenvolvimento de animais quanto de plantas, é regulada por uma seqüência de eventos bioquímicos intracelulares, portanto, necessita de vias sinalizadoras, sendo necessários sinais que atuem sobre receptores superficiais, para que a célula entre em apoptose. Os sinais podem ser positivos, quando presentes, ou negativos, quando ausentes. Por esses processos, a célula apresenta como características: alterações morfológicas no núcleo (fragmentação do

DNA ordenada em 200 pares de base pela endonucleases) e no citoplasma (picnose); o citoplasma se torna denso, com corpos apoptóticos e vesículas, e com aumento do retículo endoplasmático e da permeabilidade da membrana mitocondrial, este último elemento é o fator central durante o processo. Os corpos apoptóticos são fagocitados por células vizinhas do mesmo tipo ou por macrófagos. O apoptose ocorre pontualmente, isto é, em células que estão entre outras que funcionam normalmente.

A condensação da cromatina na periferia do núcleo é consequência do colapso da cromatina resultante do descolamento das alças cromossômicas da lâmina nuclear que se desintegra na apoptose (OBERHAMMER et al., 1993).

Estudos demonstram que a apoptose é um processo normal observado em todos (100%) os blastocistos de bovino PIV (BYRNE et al., 1999), e alguns estudos demonstram que esta não sofre influência do meio de maturação, apesar do meio interferir na qualidade do embrião (RUSSELL et al., 2006). Por outro lado, outros estudos comprovam que meios de maturação definidos aumentam a taxa de apoptose em blastocistos bovinos (WARZYCHJ et al., 2006). Sabe-se ainda que fatores do próprio animal podem interferir na taxa de apoptose, como idade, raça, fase do ciclo estral, morfologia ovariana e condição corporal (GORDON, 2003). Portanto, a apoptose ocorre durante o desenvolvimento normal de embriões produzidos tanto *in vivo* quanto *in vitro*, somente começando em estádios diferentes, embriões de 21 células e de 6 células, respectivamente (NEUBER et al., 2002).

É importante notar que o uso da análise da clivagem e desenvolvimento embrionários horas após FIV, apesar de serem métodos muito comuns em diversos laboratórios, não indica diretamente a qualidade embrionária e sua capacidade de implantação para seguir uma gestação saudável. Assim, para uma informação global da evolução do embrião em sistemas de cultura e para melhor entendimento sobre o desenvolvimento embrionário, são necessários marcadores mais específicos das condições celulares e qualidade destes embriões (RUSSELL et. al., 2006). O número de células embrionárias e o percentual de morte celular são usuais indicadores da qualidade embrionária. Quanto maior o número de células e menor a taxa de apoptose, melhor a qualidade do embrião.

No desenvolvimento inicial (quinto ao sexto ciclo celular) as células embrionárias se diferenciam em massa celular interna (MIC) e trofoblasto (TF); a MCI originará principalmente o feto, enquanto o TF dará origem às membranas extra-embrionárias (NEUBER et al., 2002). VAN SOOM et al. (2002) observaram um aumento na taxa de apoptose e uma redução na mitose com o avançar do desenvolvimento embrionário *in vitro*. YUAN et al. (2003) relataram uma maior taxa de apoptose na MCI de blastocistos em relação ao trofoblasto (TF), provavelmente para eliminar as células da MCI com potencial de TF, células inviáveis ou apenas para um controle populacional (HANDYSIDE & HUNTER, 1986; BYRNE et al., 1999; VAN SOOM et al., 2002).

Para se detectar a apoptose pode-se utilizar a técnica de “*in situ terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay*” (TUNEL), onde a enzima *deoxynucleotidyl transferase* adiciona nucleotídeos biotinilados marcados com fluoresceína no local da quebra da fita de DNA da célula em apoptose, podendo ser visualizada por microscopia de epifluorescência (YUAN et al., 2003). Quando há quebra do DNA nas regiões internucleossomais, evento resultante da apoptose, há exposição dos radicais 3'OH, a enzima *deoxynucleotidyl transferase* catalisa a polimerização da extremidade 3'(cauda poli-A), unindo a cauda poli-A com o conjugado fluorescente (FITC) e cauda poli-U, o qual mostrará a fluorescência no local da quebra das fitas de DNA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção e seleção dos oócitos

Os ovários de fêmeas bovinas foram obtidos em frigoríficos da região de Araçatuba-SP e transportados em solução salina estéril a 30-35°C. No laboratório, os ovários foram lavados em álcool 70% e posteriormente em solução salina estéril. As punções dos folículos ovarianos com diâmetro de 2 a 8 mm foram realizadas manualmente, com auxílio de agulha de calibre 18G (1,20×40 mm), adaptada a seringa de 20 ml, ambas descartáveis. O limite máximo de tempo decorrido desde o abate até o início das aspirações foi de 6 horas. Todo o material aspirado foi transferido para tubos plásticos de 50 ml que foram mantidos em repouso para decantação por 15 minutos. O sedimento foi transferido para placas de poliestireno de 60 mm de diâmetro e avaliado sob estereomicroscópio para seleção e classificação dos oócitos. Somente oócitos com *cumulus* compacto (complexos *cumulus*-oócito – COCs), contendo pelo menos 4 camadas de células e de aparência saudável (citoplasma de granulação homogênea) foram selecionados para o cultivo de maturação.

3.2. Bloqueio meiótico durante simulação de transporte

Os oócitos selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem (meio TCM-199 suplementado com 0,2 mM de piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de bicarbonato de sódio, 75 µg/ml de gentamicina). Para o bloqueio da meiose, os oócitos foram cultivados *in vitro* em meio de pré-maturação (constituído por meio TCM-199, suplementado com 0,2 mM de piruvato, 20 mM de bicarbonato de sódio e 75 µg/ml de gentamicina). Dependendo do grupo experimental, o meio de pré-maturação foi suplementado com: 1) 10 µM de Butirolactona I (grupo B); 2) 10 µM de Butirolactona I e 20 mM de HEPES (grupo BH); 3) 100 µM de Butirolactona I e 0,3% de BSA (grupo BB); e 4) 100 µM de Butirolactona I, 0,3% de BSA e 20 mM de HEPES (grupo BBH). Para simulação das condições de transporte dos oócitos da fazenda até o laboratório, os

oócitos foram cultivados em criotubos (15 oócitos/criotubo) em microgotas de 60 µl de meio de pré-maturação coberto com óleo mineral, os quais foram acondicionados em estufa portátil Minitub, em atmosfera ambiente e temperatura de 38,5°C durante as primeiras 5 horas; após, os criotubos foram transferidos para incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ em ar e temperatura de 38,5°C, onde permaneceram por mais 19 horas, totalizando 24 horas de cultivo de pré-maturação.

3.3. Maturação *in vitro*

Após a pré-maturação, os oócitos foram lavados em meio livre de inibidor e foram transferidos para placa de cultivo contendo meio de maturação (meio TCM-199 suplementado com 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio, 75 µg/ml de gentamicina, 0,5 µg/ml de FSH, 100 UI/ml de hCG e 0,6% de BSA).

Os oócitos dos grupos controle foram submetidos à maturação sem passar por cultivo prévio de bloqueio. Foram feitos 2 grupos controle: 1) Grupo Controle 1: oócitos foram maturados em microgotas de 100 µl de meio de maturação em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ em ar a 38,5°C, durante 24 horas; 2) Grupo Controle 2: oócitos foram maturados em criotubos contendo 60 µl de meio de maturação coberto com óleo mineral, os quais foram acondicionados em estufa portátil Minitub sob as mesmas condições anteriormente descritas para os grupos com bloqueio da meiose.

O cultivo de maturação *in vitro* foi feito a 38,5°C em atmosfera com 5% de CO₂ em ar durante 24 h (grupos controle) ou 20 h (oócitos pré-maturados). A duração do cultivo de maturação foi de 20 horas ao invés das usuais 24 horas, já que após remoção do meio com inibidor da meiose há aceleração da meiose, conforme previamente determinado em nosso laboratório (BARRETTO, 2007).

3.4. Determinação do estágio da meiose (Coloração com Hoechst 33342)

Os oócitos foram avaliados quanto à dinâmica da maturação nuclear imediatamente após remoção do folículo (0 horas) e após 20 e 24 horas de cultivo de maturação. Para remoção das células do *cumulus*, os COCs foram transferidos para microtubos com 500 µl de PBS acrescido de 0,1% hialuronidase e agitados em vortex

durante 4 minutos. Os oócitos desnudos foram fixados em formamida 4%, permeabilizados com triton 1% e corados com Hoechst 33342 (10 µg/ml) entre lâmina e lamínula. Para análise quanto aos estádios da meiose (VG, M I e M II), as lâminas foram visualizadas em microscópio equipado com epifluorescência (Microscópio Olympus IX 51; excitação 330 a 385 nm e emissão 420 nm). A classificação das diversas fases da meiose pode ser observada na Figura 1.

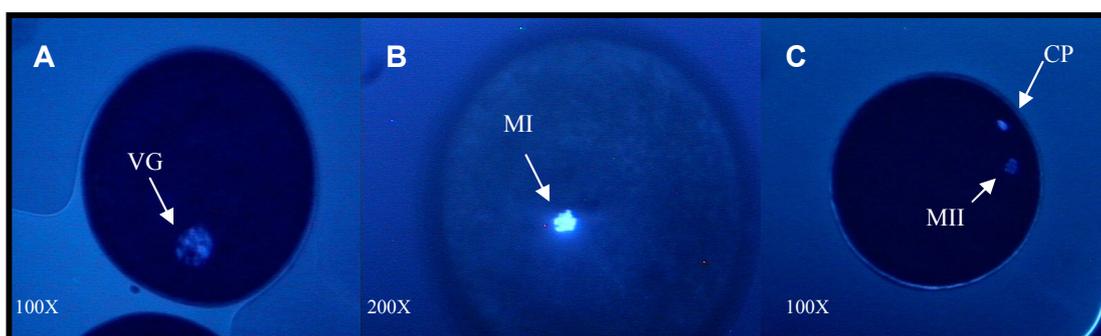


Figura 1 - Fotomicrografia das diversas fases da maturação nuclear de oócitos bovinos observados sob microscópio de epifluorescência A) Oócitos em VG: cromatina descondensada; B) Oócitos em M I: cromatina condensada; C) Oócitos em M II: cromatina condensada na placa metafásica e no primeiro corpúsculo polar (1° CP).

3.5. Determinação da maturação citoplasmática

A maturação citoplasmática foi avaliada pela determinação do padrão de redistribuição dos grânulos corticais (coloração com Lectina- *Lens culinaris*) e também pelo padrão de redistribuição das mitocôndrias e avaliação do potencial de membrana mitocondrial (coloração com JC-1). Os oócitos foram corados imediatamente após remoção do folículo (0 horas) e após 20 e 24 horas de cultivo de maturação.

3.5.1. Coloração das mitocôndrias com JC-1

Os oócitos foram desnudados e corados com iodeto de 5,5,6,6' – tetracloro - 1,1,3,3' – tetraetilbenzimidazolil-carbocianina (JC-1; Molecular Probes, T-3168) em meio

de maturação (concentração de 1 mg/ml). Estes foram incubados em estufa à 37°C por 20 minutos e em seguida foram lavados em PBS acrescido de 0,5% PVA. As lâminas foram montadas em gel Mowiol-Hoechst e a leitura foi realizada imediatamente sob microscopia de epifluorescência (microscópio Olympus IX 51 - Japão) em filtro com excitação de 460-570 nm e emissão de 460-610 nm.

De acordo com o padrão de distribuição das mitocôndrias (ADONA et al., 2008) os oócitos foram classificados em dois grupos: mitocôndrias periféricas – oócito imaturo; mitocôndrias dispersas – oócitos maduros (Figura 2). Os oócitos foram ainda classificados de acordo com o potencial da membrana mitocondrial (CELEGHINI et al., 2007; MESQUITA, 2005): células JC-1-positivas (alto potencial mitocondrial): mitocôndrias coradas em vermelho ou laranja; células JC-1-negativas (baixo potencial mitocondrial): mitocôndrias coradas em verde (Figura 2).

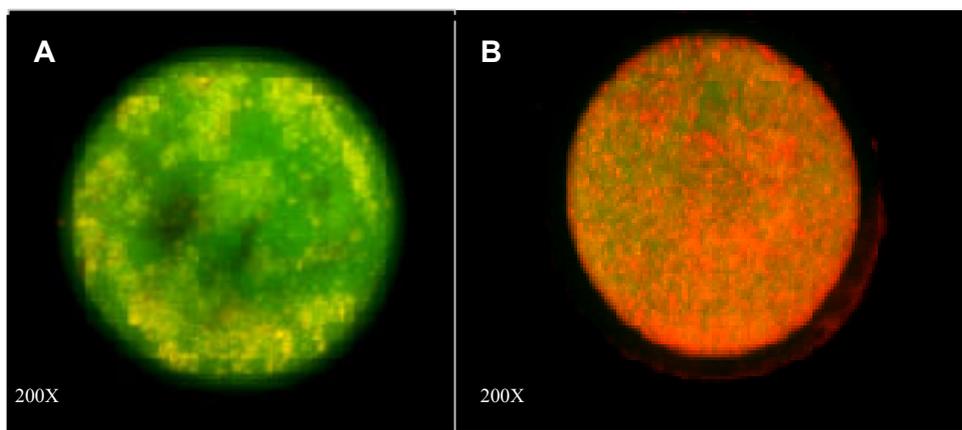


Figura 2 - Fotomicrografia da distribuição e do potencial das membranas mitocondriais de oócitos bovinos corados com JC-1 e avaliados sob microscópio de epifluorescência. A) Oócito sem potencial de membrana mitocondrial e distribuição predominantemente periférica das mitocôndrias; B) Oócito com potencial de membrana mitocondrial e distribuição geral das mitocôndrias.

3.5.2. Coloração dos Grânulos Corticais com Lectina - *Lens culinaris*

Para avaliação dos grânulos corticais, os oócitos foram desnudados e a zona pelúcida (ZP) foi removida com 0,5% de pronase (Sigma, P8811) em PBS a 37^oC, por aproximadamente 6 minutos. Após, os oócitos foram fixados em 3% de paraformoldeído em PBS durante 30 minutos, e foram então incubados em solução de bloqueio [SB: PBS suplementado com 0,5% PVA, 0,751% glicina (Sigma G8790) e 0,2% azida sódica (Reserch Organics, 0939S)] a 4^oC durante a noite. Os oócitos foram permeabilizados por 5 minutos em SB acrescida de 0,1% de Triton X-100 e a seguir foram incubados em 10 µg/mL de *Lens culinaris* aglutinina conjugado à isotiocianato de fluoresceína (FITC-LCA; esta lecitina se liga especificamente à α -D-manose presente nos grânulos corticais) em SB por 15 min. Em seguida, os oócitos foram lavados em SB 3 vezes. As lâminas foram montadas em gel Mowiol-Hoechst e visualizadas em microscópio de epifluorescência (Microscópio Olympus IX 51 - Japão; excitação 460 a 570 nm e emissão 460-610 nm). De acordo com o padrão de distribuição dos grânulos corticais, os oócitos foram classificados em três grupos: GC distribuídos em "clusters" – oócito imaturo, GC dispersos (periféricos) e parcialmente em "clusters" – parcialmente maduros e GC periféricos – oócitos maduros (Figura 3), de acordo com HOSOE e SHIOYA (1996) e BARRETTO (2007).

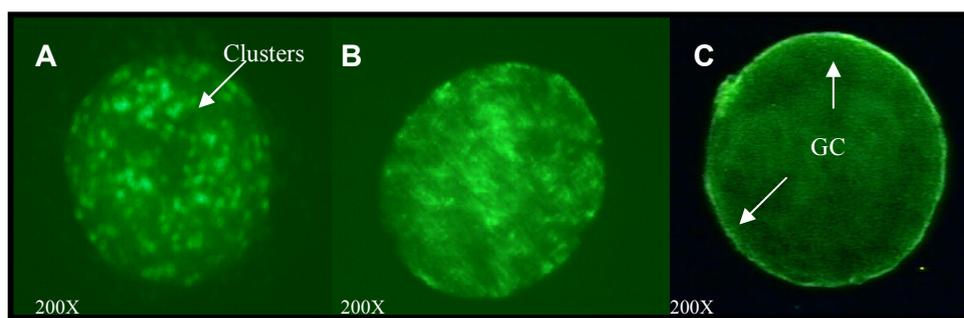


Figura 3 - Fotomicrografia da distribuição dos grânulos corticais de oócitos bovinos observados sob microscópio de epifluorescência A) Oócito imaturo com distribuição dispersa em cluster dos GC; B) Oócito parcialmente maduro com GC dispostos tanto no centro como na periferia; C) Oócito maduro com distribuição periférica dos GC.

3.6. Fertilização *in vitro*

Após o cultivo de maturação (24 horas para os grupos sem inibidores de maturação nuclear, e 20 horas para os grupos com inibidores), os COCs foram submetidos à fecundação *in vitro*. Foi utilizado sêmen de um único doador da raça Nelore, de um único lote. A palheta foi descongelada em banho-maria a 35-37°C durante 30 segundos e os espermatozoides vivos foram separados do diluidor por sedimentação em gradiente descontínuo de Percoll de duas fases (90 e 45%). Após remoção do sobrenadante, adicionou-se ao tubo 1 ml de meio "Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate" (TALP) suplementado com HEPES (10 mM) e o sêmen foi novamente centrifugado a $270 \times g$ durante 5 minutos. O sedimento foi recuperado e avaliado quanto às suas características (motilidade e concentração espermática). A concentração foi ajustada para 25×10^6 espermatozoides vivos por ml de meio de fecundação [TALP suplementado com 0.2 mM piruvato de sódio, 6 mg/ml BSA, 25 mM bicarbonato de sódio, 13 mM lactato de sódio, 75 µg/ml kanamicina, 4 µl/ml solução PHE solution (2 mM penicilamina, 1 mM hipotaurina e 250 µM epinefrina) e 10 µg/ml heparina. Foram adicionados 4 µl desta diluição para cada gota de fecundação, sendo que a concentração final foi de 100×10^3 espermatozoides por gota de meio de fecundação (20 oócitos/microgota). A fecundação foi realizada a 38,5°C, por 24 horas em incubadora contendo 5% CO₂ em ar atmosférico e 99% de umidade.

3.7. Avaliação dos pró-núcleos

Após 18 horas de co-incubação dos oócitos e espermatozoides, os prováveis zigotos foram desnudados por agitação em vortex em meio TALP-HEPES por 4 minutos. Em seguida, removeu-se a ZP com 0,5% de pronase em PBS a 37°C. Os zigotos foram fixados em 3% de paraformaldeído em PBS durante 30 minutos, lavados 2 vezes em PBS-PVP e montados em lâminas sobre gel Mowiol-Hoechst. As lâminas foram visualizadas em microscópio de epifluorescência (Microscópio Olympus IX 51; excitação 330 a 385 nm e emissão 420 nm).

Os zigotos foram classificados de acordo com o número de pró-núcleos (PN) visualizados: 1) - 2 PN: oócitos não fecundados; 2) 2 PN: oócitos fecundados; 3) + 2PN:

polispermia (GORDON, 1989; AVERY, 2003). A classificação utilizada pode ser visualizada na Figura 4.

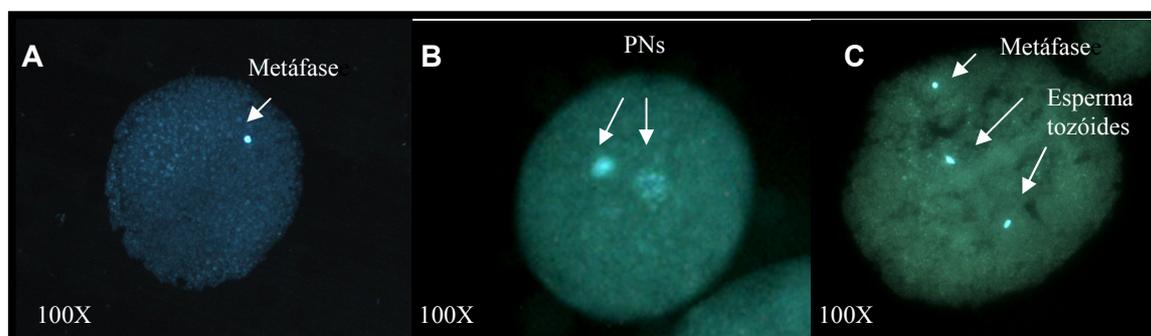


Figura 4 – Fotomicrografia de epifluorescência de oócitos 18 horas pós inseminação. A) oócito sem formação de PN (não fecundado). B) Oócito com a formação de 2 PN (fecundado). C) Oócito com duas cabeças de espermatozóides (polispermia).

3.8. Cultivo de desenvolvimento embrionário *in vitro*

Após fecundação, os zigotos foram parcialmente desnudados com auxílio de um micro-pipetador de 100 μ l e foram então transferidos para microgotas de 100 μ l de meio sintético de fluido de oviduto (SOF, suplementado com 0,2 mM L-glutamina, 0,34 mM citrato de sódio, 2,8 mM myo-inositol, 2% solução MEM aminoácidos essenciais, 1% solução MEM aminoácidos não-essenciais, 0,2 mM piruvato de sódio, 75 μ g/ml kanamicina, 5 mg/ml BSA e 2,5% soro fetal bovino). O cultivo foi conduzido em incubadora à temperatura de 38,5°C, contendo 5% de CO₂ em ar atmosférico e 99% de umidade, durante 7 dias. A cada 48 horas, 50% do meio de cultivo foi renovado. A avaliação do desenvolvimento embrionário foi realizada às 48 horas (clivagem), 168 horas (formação de blastocistos – D7) e 192 horas (blastocistos eclodidos e em processo de eclosão – D8) pós-inseminação (hpi).

3.9. Determinação do número de células e taxa de apoptose (coloração “Terminal Transferase Assay” – TUNEL)

As células em apoptose dos embriões foram marcadas pela coloração “*In situ* terminal deoxinucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay” (TUNEL), descrita por PAULA-LOPES e HANSEN (2002). Os blastocistos foram lavados por quatro vezes em 100 µl de PBS com PVP (1 mg/ml) (PBS-PVP) e posteriormente fixados, com a zona pelúcida intacta, em 100 µl de solução de paraformaldeído (4% em PBS, pH 7,4) a temperatura ambiente por 1 hora. Os embriões foram lavados em PBS-PVP e foram armazenados sob refrigeração (4°C), por 1 a 7 dias, para posterior processamento. Estes embriões foram então permeabilizados em solução de Triton X-100 (0,5%, v/v) em citrato de sódio (0,1%), por 30 minutos em temperatura ambiente. Os embriões reservados para controle positivo foram incubados com DNase I (50 UI/ml de água Milli-Q) (RNase free) a 37°C por 1 hora, enquanto que os embriões dos tratamentos ficaram em gotas de 100 µl de PBS-PVP. Posteriormente, todos os embriões foram lavados em PBS-PVP e incubados em câmara úmida com 15 µl da mistura (1:9, da enzima – tubo 1 e do tampão da enzima – tubo 2, respectivamente) para a coloração TUNEL (*In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Diagnostics, Germany), por 1 hora a 37°C no escuro. Os embriões reservados para controle negativo foram incubados na ausência da enzima “terminal deoxinucleotidyl transferase” (TdT) (tubo 1, contida no kit). Os embriões foram incubados em RNase A (50 µg/ml de água Milli-Q) por 1 hora em temperatura ambiente, seguida por incubação com Hoechst 33342 (1 µg/ml em PBS-PVP) por 30 minutos em temperatura ambiente. Por fim, estes embriões foram lavados em PBS-PVP e colocados entre lâmina e lamínula com glicerina tamponada (9:1). Os blastocistos foram avaliados em microscópio de epifluorescência (Microscópio Olympus IX 51 – Japão) quanto ao número de células com fragmentação de DNA (células TUNEL-positivas: fluorescência verde ou amarela pontual dentro do núcleo; visualizado com filtro de excitação de 510-550 nm e emissão de 590 nm excitação) localizadas na MCI ou no TF em relação ao número total de células do blastocisto, determinado pelos núcleos corados em azul pelo

Hoechst (visualizado com filtro de excitação de 330 a 385 nm e emissão 420 nm)
(Figura 5)

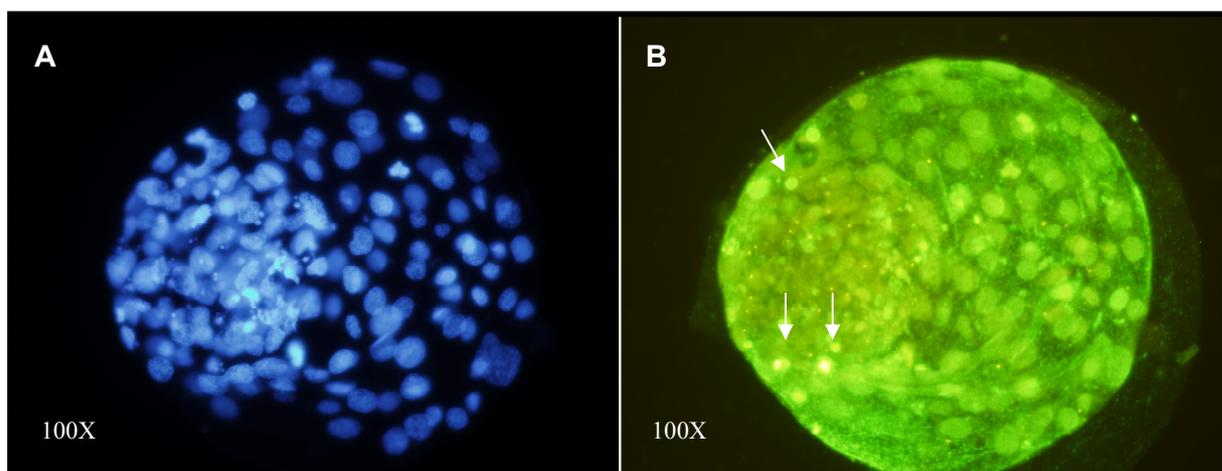


Figura 5. Fotomicrografia de epifluorescência de embriões 192hpi submetidos à técnica TUNEL. A) Coloração Hoechst 33342 para contagem do número de células totais. B) Coloração com FITC (nucleotídeo marcado). As setas indicam alguns pontos de apoptose marcados com FITC. A coloração verde que aparece no citoplasma é background.

3.10. Delineamento Experimental

Foram realizados quatro experimentos. Os grupos experimentais e o delineamento experimental estão sumarizados na Figura 6.

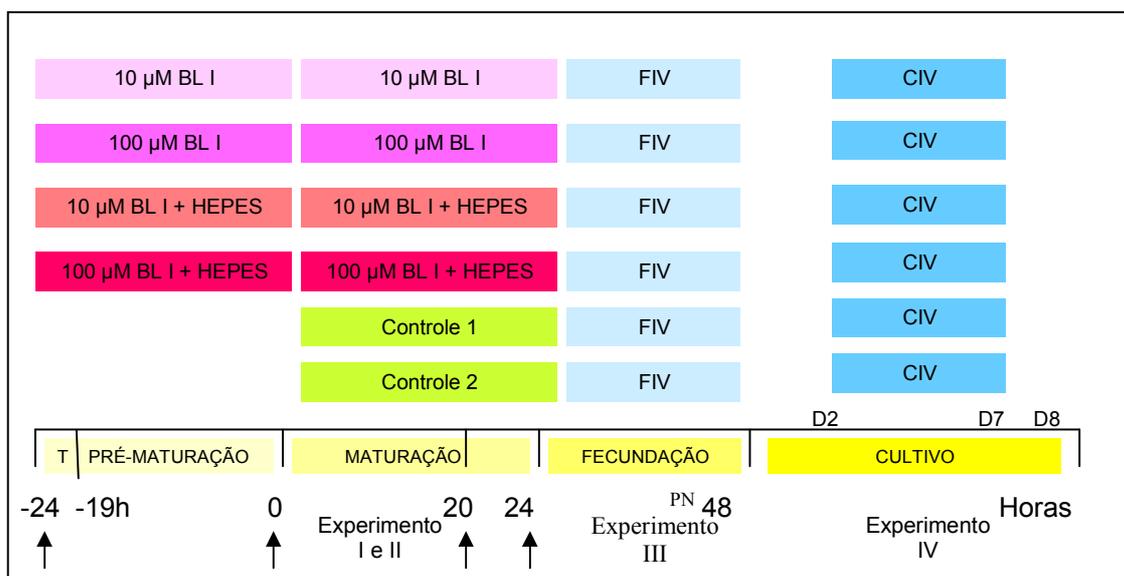


Figura 6. Esquema representativo do delineamento experimental. As setas indicam os momentos onde foi avaliada a maturação nuclear e citoplasmática. T- transporte 5h. em estufa Minitub. PN - análise pró-núcleos 18 hpi. D2: avaliação da clivagem; D7: avaliação do desenvolvimento embrionário; D8: avaliação desenvolvimento e qualidade embrionária.

3.10.1. Experimento I - Efeito de diferentes concentrações de butirolactona I sobre o bloqueio da meiose durante o transporte e sua reversibilidade.

Este experimento foi realizado para determinar a concentração de BI-I com melhor eficiência no bloqueio da meiose durante transporte simulado. Na primeira parte deste experimento, oócitos ($n = 434$, em 6 repetições) foram pré-maturados em meio de pré-maturação contendo duas concentrações de BI-I, e na presença ou ausência de HEPES: 1) 10 μM de BI-I (grupo B); 2) 10 μM de BI-I e 20 mM de HEPES (grupo BH); 3) 100 μM de BI-I e 0,3% de BSA (grupo BB); e 4) 100 μM de BI-I, 0,3% de BSA e 20 mM de HEPES (grupo BBH). Oócitos foram cultivados em criotubos acondicionados em estufa portátil Minitub por 5 horas, e posteriormente foram transferidos para incubadora com 5% CO_2 em ar durante 19 horas adicionais (período total de 24 horas). Os oócitos foram avaliados quanto ao bloqueio da meiose (estádio de vesícula germinativa). Um

grupo de oócitos foi avaliado imediatamente após a remoção do folículo (controle 0 horas).

A segunda parte deste experimento foi realizada para determinar a reversibilidade do bloqueio da meiose pela BI-I durante o transporte. Oócitos ($n = 597$, em 6 repetições) foram pré-maturados nas mesmas condições anteriormente descritas e, a seguir, foram maturados *in vitro* por 20 horas. Oócitos dos grupos controle foram maturados *in vitro* sem passar por prévio cultivo de pré-maturação: 1) Controle 1 (C1): oócitos cultivados por 24 horas em incubadora com 5% CO₂ em ar; 2) Controle 2 (C2): oócitos cultivados por 5 horas em estufa portátil Minitub e por 19 horas em incubadora com 5% CO₂ (período total de 24 horas). Após maturação, os oócitos foram avaliados quanto às fases da meiose.

3.10.2. Experimento II - Efeito do bloqueio da meiose com butirolactona I durante o transporte sobre a maturação citoplasmática.

Este experimento foi realizado para avaliar os efeitos do bloqueio da meiose sobre a maturação citoplasmática. Oócitos foram avaliados após a pré-maturação (24 horas de bloqueio) quanto à distribuição dos grânulos corticais ($n = 428$, em 6 repetições). Outros oócitos foram avaliados quanto à distribuição citoplasmática das mitocôndrias e potencial de membrana mitocondrial ($n = 421$, em 6 repetições).

Outros oócitos foram novamente avaliados após a maturação (20 horas de MIV para os grupos com bloqueio da meiose e 24 horas de MIV para os grupos controle. Grânulos corticais: $n = 502$, em 6 repetições; mitocôndrias: $n = 584$, em 6 repetições).

3.10.3. Experimento III - Efeito do bloqueio da meiose com butirolactona I durante o transporte sobre a fecundação.

Oócitos ($n = 572$, em 4 repetições) foram pré-maturados e maturados como anteriormente descrito e posteriormente foram fecundados e avaliados quanto à formação de pró-núcleos às 18 horas após inseminação (hpi). Foi avaliada a correlação entre a porcentagem de oócitos fecundados e a porcentagem de oócitos com distribuição de GC periféricos (GC maduros); avaliou-se também a correlação entre a

porcentagem de oócitos com + 2 pró-núcleos e a porcentagem de oócitos com GC dispersos (GC imaturos).

3.10.4. Experimento VI - Efeito do bloqueio da meiose com butirolactona I durante o transporte sobre o desenvolvimento e qualidade embrionária

Oócitos ($n = 1615$, em 7 repetições) foram pré-maturados e maturados como anteriormente descrito e posteriormente foram fecundados e cultivados *in vitro* por 8 dias. Foram avaliados o desenvolvimento embrionário (clivagem e desenvolvimento até a fase de blastocisto no D8) e a qualidade embrionária (determinação do número de células totais e apoptóticas em blastocistos no D8).

3.11. Análise Estatística

Para avaliação do efeito da butirolactona I sobre a maturação nuclear e citoplasmática, fecundação, desenvolvimento e qualidade embrionária, os dados foram analisados pela fração de oócitos cultivados que atingiram os estádios determinados de desenvolvimento, reportados em termos de porcentagem (%). Como as porcentagens não obtiveram distribuição normal, os dados foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{\%}$. Foi aplicada análise de variância (ANOVA) para comparação dos tratamentos e posteriormente foi aplicado teste de Tukey para comparação múltipla das médias.

Os dados referentes à distribuição citoplasmática das organelas foram avaliados pelo teste do qui-quadrado (χ^2) para verificação de possível associação entre a fase da meiose e a distribuição citoplasmática das mitocôndrias e dos grânulos corticais.

Para análise de correlação entre fecundação, distribuição dos grânulos corticais e partenogênese foi realizado o teste de correlação de Pearson.

O nível de significância adotado foi de 5%. A análise estatística foi efetuada empregando-se o sistema SAS (Statistical Analysis System).

4. RESULTADOS

4.1. Experimento I

A maioria dos oócitos imaturos avaliados imediatamente após a aspiração folicular (controle 0 horas) encontrava-se em GV (93,3%), sendo este resultado superior ($P<0,05$) aos oócitos tratados com BI-I durante o cultivo de pré-MIV (Tabela 1).

Embora em proporção inferior ao grupo controle, a maioria dos oócitos tratados com BI-I permaneceu com a meiose bloqueada (GV) nos diferentes grupos avaliados (51,4, 45,8, 69,5 e 51,7% para B, BH, BB e BBH, respectivamente), sendo que a eficiência no bloqueio da meiose foi reduzida no grupo BH em comparação com o grupo BB ($P<0,05$).

Dentre os oócitos tratados com BI-I que não permaneceram bloqueados em GV, muitos se encontravam em metáfase I, anáfase I ou telófase I, fases intermediárias da meiose (20,0, 19,5, 20,6%, respectivamente para BH, BB e BBH), sendo superiores ($P<0,05$) ao grupo C (5,4%). Ainda, muitos oócitos tratados com BI-I concluíram a meiose (M II), sendo que todos os grupos (12,5 – 33,3%) foram superiores ($P<0,05$) ao grupo C (0,0%). A eficiência do bloqueio da meiose foi diminuída quando se reduziu a concentração de BI-I, já que maiores proporções ($P<0,05$) de oócitos do grupo B (33,3%) atingiram M II quando em comparação com o grupo BB (12,5%).

Após remoção do meio com BI-I e cultivo de MIV, observou-se que alguns oócitos permaneceram em GV (25,3, 18,1 e 18,4%, respectivamente para os grupos BH, BB e BBH), mas estes grupos não diferiram ($P>0,05$) dos grupos controle C1 (6,0%) e C2 (10,8%). No entanto, uma maior proporção ($P<0,05$) de oócitos do grupo B (29,5%) permaneceu em GV quando comparado ao grupo C1 (6,0%).

A maioria dos oócitos dos grupos C1 (80,5%) e C2 (64,4%) encontrava-se em M II após cultivo de MIV, sem diferença entre estes grupos ($P>0,05$). Não foi observada diferença entre os oócitos de todos os grupos tratados com BI-I que atingiram M II após o cultivo de MIV (46,0 – 62,4%), os quais não diferiram ($P>0,05$) do grupo C2 (64,4%). Por outro lado, a proporção de oócitos que atingiram M II nos grupos B (47,4%) e BH (46,0%) foi inferior ($P<0,05$) ao grupo C1 (80,5%).

A porcentagem de oócitos degenerados após a MIV foi de aproximadamente 2% para todos os grupos ($P<0,05$). A clivagem partenogenética espontânea durante o cultivo de pré-MIV seguido do cultivo de MIV foi elevada ($P<0,05$) no grupo BH (10,0%) em comparação com os grupos C1, C2 e BB (0,0%).

Tabela 1 - Estádio da meiose em oócitos submetidos ao bloqueio meiótico por 24 horas com butirolactona I e de oócitos maturados *in vitro* após remoção do meio contendo o bloqueador.

Tratamento	MIV (h)	Oócitos (N)	Fase da meiose (média % \pm EPM)				
			VG	Intermediária (M I, A I, T I)	M II	Parteno	Degenerado
Oócitos imaturos							
C0		89	93,3 \pm 2,8 ^a	5,4 \pm 2,3 ^b	0,0 \pm 0,0 ^c	0,0 \pm 0,0	1,3 \pm 1,3
B		83	51,4 \pm 4,6 ^{bc}	12,7 \pm 3,1 ^{ab}	33,3 \pm 6,3 ^a	1,6 \pm 1,6	1,2 \pm 1,2
BH	0	94	45,8 \pm 3,3 ^c	20,0 \pm 3,5 ^a	23,9 \pm 3,6 ^{ab}	5,9 \pm 2,7	3,7 \pm 1,6
BB		83	69,5 \pm 2,3 ^b	19,5 \pm 3,6 ^a	12,5 \pm 4,3 ^b	0,0 \pm 0,0	1,3 \pm 1,3
BBH		85	51,7 \pm 3,5 ^{bc}	20,6 \pm 1,2 ^a	16,9 \pm 2,9 ^{ab}	5,4 \pm 2,2	4,5 \pm 2,8
Oócitos maduros							
C1	24	152	6,0 \pm 5,4 ^b	13,0 \pm 2,0	80,5 \pm 2,3 ^a	0,0 \pm 0,0 ^b	0,0 \pm 0,0
C2		108	10,8 \pm 4,6 ^{ab}	24,5 \pm 4,2	64,4 \pm 4,4 ^{ab}	0,0 \pm 0,0 ^b	3,5 \pm 2,3
B		82	29,5 \pm 8,7 ^a	14,0 \pm 5,5	47,4 \pm 9,7 ^b	4,0 \pm 2,6 ^{ab}	1,4 \pm 1,4
BH	20	84	25,3 \pm 6,0 ^{ab}	14,8 \pm 3,3	46,0 \pm 6,1 ^b	10,5 \pm 4,1 ^a	1,3 \pm 1,3
BB		86	18,1 \pm 2,4 ^{ab}	9,7 \pm 3,5	62,4 \pm 3,4 ^{ab}	0,0 \pm 0,0 ^b	4,0 \pm 2,6
BBH		85	18,4 \pm 3,5 ^{ab}	19,7 \pm 5,0	58,2 \pm 4,6 ^{ab}	5,1 \pm 1,6 ^{ab}	1,8 \pm 1,8

Letras diferentes na mesma coluna de oócitos imaturos ou maduros diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$). **VG**: Vesícula Germinativa; **M I**: Metáfase I; **A I**: Anáfase I; **T I**: telófase I; **MII**: Metáfase II; **Parteno.**: Partenogenéticos; **Deg.**: Degenerados; **C0**= oócitos avaliados logo após aspiração folicular ; **C1**= controle 1: BSA (0,6%) oócitos maturados *in vitro* por 24 horas em incubadora 5% CO₂; **C2** = controle 2: BSA (0,6%) oócitos maturados *in vitro* por 5 horas em estufa Minitub e 19 horas em incubadora 5% CO₂; **B**= pré-MIV Butirolactona 10 μ M / MIV BSA (0,6%); **BH**= pré-MIV Butirolactona 10 μ M + HEPES 20 mM/ MIV BSA (0,6%); **BB**= pré-MIV BSA (0,3%) + Butirolactona 100 μ M / MIV BSA (0,6%); **BBH**= pré-MIV BSA (0,3%) + Butirolactona 100 μ M + HEPES 20 mM/ MIV BSA (0,6%)

4.2. Experimento II

A maioria das mitocôndrias dos oócitos imaturos avaliados imediatamente após a aspiração folicular (controle 0 hora) encontrava-se localizada na periferia do citoplasma do oócito (imaturas; 80,9%), sendo esta proporção maior ($P < 0,05$) do que aquela observada nos oócitos tratados com BI-I (48,5 – 58,2%) (Tabela 2). A distribuição dispersa das mitocôndrias (maturas) foi maior ($P < 0,05$) nos oócitos tratados com BI-I (42,1 – 51,5%) em comparação com o grupo C0 (19,0%). O potencial de membrana mitocondrial positivo (média geral: 71,6%) ou negativo (média geral: 28,4%) foi similar entre os grupos ($P > 0,05$).

Após remoção do meio com BI-I e cultivo de MIV, a distribuição mitocondrial periférica foi em média 29% para todos os grupos ($P > 0,05$) e a distribuição dispersa média para todos os grupos foi 70,9% ($P > 0,05$). Não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre potencial mitocondrial positivo (média dos grupos: 73,1%) ou negativo (média dos grupos: 27,1%) para todos os grupos (Tabela 2).

Com relação à distribuição dos GCs, independentemente do grupo de oócitos imaturos ($P > 0,05$), observou-se que a grande maioria encontrava-se dispersa (imaturado; média geral: 41,6%) ou parcialmente dispersa (parcialmente maturo; média geral: 36,4%) pelo citoplasma (Tabela 3); nestes oócitos, a maioria encontrava-se em fase de GV da meiose (Figura 7). Nos oócitos tratados com baixa concentração de BI-I (10 μ M), observou-se maior migração dos GCs para a periferia do oócito (B: 31,0% e BH: 40,1%; $P < 0,05$) em comparação com o grupo controle (7,4%) e grupos com maior concentração de BI-I (100 μ M; BB: 10,9 e BBH: 15,1%).

Após remoção do meio com BI-I e cultivo de MIV, a distribuição dispersa dos CGs foi muito baixa e semelhante entre os grupos (1,6%; $P > 0,05$). A dispersão parcial dos GCs no grupo C1 (12,2%) foi menor ($P < 0,05$) do que no grupo C2 (35,4%), o contrário ocorrendo com a distribuição periférica (83,6 vs 61,7%, respectivamente; $P < 0,05$). Não foi observada diferença ($P > 0,05$) na distribuição periférica (maturados) dos GCs nos oócitos do grupo C2 (61,7%) e dos oócitos tratados com BI-I (52,3, 68,6, 72,9

e 65,0%, respectivamente para B, BH, BB e BBH), todavia apenas os grupos BH e BB foram similares ($P>0,05$) ao grupo C1 (83,6%).

Tabela 2 – Distribuição e potencial de membrana mitocondrial em oócitos submetidos ao bloqueio meiótico por 24 horas com butirolactona I e de oócitos maturados *in vitro* após remoção do meio contendo o bloqueador.

Tratamento	MIV (h)	Oócitos (N)	Distribuição mitocondrial (média % ± EPM)		Potencial de membrana mitocondrial (média % ± EPM)	
			Periféricas	Dispersas	JC-1 Positivo	JC-1 Negativo
Oócitos imaturos						
C0		80	80,9 ± 4,6 ^a	19,0 ± 4,6 ^b	75,0 ± 6,0	25,0 ± 6,0
B		84	58,2 ± 2,4 ^b	42,1 ± 2,4 ^a	70,8 ± 6,2	29,2 ± 6,2
BH	0	90	48,5 ± 3,5 ^b	51,5 ± 3,5 ^a	80,0 ± 2,3	20,0 ± 2,3
BB		82	55,5 ± 2,9 ^b	44,5 ± 2,9 ^a	70,8 ± 6,1	29,2 ± 6,1
BBH		85	51,0 ± 5,8 ^b	49,0 ± 5,8 ^a	61,4 ± 4,3	38,6 ± 4,3
Oócitos maduros						
C1	24	148	24,2 ± 5,9	75,8 ± 5,9	68,6 ± 9,7	31,4 ± 9,7
C2		105	30,0 ± 7,2	69,2 ± 7,2	70,9 ± 9,5	30,6 ± 9,5
B		83	38,9 ± 6,8	61,2 ± 6,8	63,7 ± 6,1	36,3 ± 6,1
BH	20	83	31,0 ± 6,7	69,0 ± 6,7	76,1 ± 5,0	23,8 ± 5,0
BB		82	28,7 ± 4,8	71,3 ± 4,8	86,4 ± 2,6	13,6 ± 2,6
BBH		83	21,3 ± 4,1	78,6 ± 4,1	73,1 ± 5,5	27,0 ± 5,5

Letras diferentes na mesma coluna de oócitos imaturos ou maduros diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$). Periféricas: mitocôndrias distribuídas principalmente na região cortical do citoplasma. Dispersas: mitocôndrias distribuídas por todo citoplasma. JC-1 positivo: oócitos com potencial de membrana mitocondrial. JC-1 negativo : oócitos sem potencial de membrana mitocondrial. **VG**: Vesícula Germinativa; **M I**: Metáfase I; **A I**: Anáfase I; **T I**: telófase I; **MII**: Metáfase II; **Parteno.**: Partenogénéticos; **Deg.**: Degenerados; **C0**= oócitos avaliados logo após aspiração folicular ; **C1**= controle 1: BSA (0,6%) oócitos maturados *in vitro* por 24 horas em incubadora 5% CO₂; **C2** = controle 2: BSA (0,6%) oócitos maturados *in vitro* por 5 horas em estufa Minitub e 19 horas em incubadora 5% CO₂; **B**= pré-MIV Butirolactona 10 µM / MIV BSA (0,6%); **BH**= pré-MIV Butirolactona 10 µM + HEPES 20 mM/ MIV BSA (0,6%); **BB**= pré-MIV BSA (0,3%) + Butirolactona 100 µM / MIV BSA (0,6%); **BBH**= pré-MIV BSA (0,3%) + Butirolactona 100 µM + HEPES 20 mM/ MIV BSA (0,6%).

Tabela 3 - Distribuição dos grânulos corticais em oócitos submetidos ao bloqueio meiótico por 24 horas com butirolactona I e de oócitos maturados *in vitro* após remoção do meio contendo o bloqueador.

Tratamento	MIV (h)	Oócitos (N)	Distribuição dos Grânulos Corticais (média % ± EPM)		
			Dispersos	Parcialmente dispersos	Periféricos
Oócitos imaturos					
C0		106	49,8 ± 4,0	38,4 ± 4,5	7,4 ± 1,9 ^c
B		76	34,1 ± 4,8	34,9 ± 5,7	31,0 ± 4,4 ^{ab}
BH	0	87	34,4 ± 6,0	25,4 ± 8,8	40,1 ± 8,6 ^a
BB		77	49,0 ± 7,3	41,7 ± 7,1	10,9 ± 1,5 ^c
BBH		82	41,0 ± 3,1	41,7 ± 5,3	15,1 ± 1,9 ^{bc}
Oócitos maduros					
C1		108	1,7 ± 1,6	12,2 ± 1,4 ^c	83,6 ± 2,1 ^a
C2	24	86	1,8 ± 1,8	35,4 ± 5,5 ^{ab}	61,7 ± 2,9 ^{bc}
B		76	0,8 ± 0,8	41,0 ± 6,4 ^a	52,3 ± 6,1 ^c
BH		76	5,4 ± 2,7	23,3 ± 2,4 ^{bc}	68,6 ± 5,5 ^{abc}
BB	20	80	0,0 ± 0,0	27,1 ± 2,8 ^{ab}	72,9 ± 2,8 ^{ab}
BBH		76	0,0 ± 0,0	31,8 ± 2,8 ^{ab}	65,0 ± 2,4 ^{bc}

Letras diferentes na mesma coluna de oócitos imaturos ou maduros diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Dispersos: clusters de grânulos corticais distribuídos pelo citoplasma. Periféricos: mitocôndrias distribuídas principalmente na região cortical do citoplasma. **VG**: Vesícula Germinativa; **M I**: Metáfase I; **A I**: Anáfase I; **T I**: telófase I; **MII**: Metáfase II; **Parteno.**: Partenogénéticos; **Deg.**: Degenerados; **C0**= oócitos avaliados logo após aspiração folicular ; **C1**= controle 1: BSA (0,6%) oócitos maturados *in vitro* por 24 horas em incubadora 5% CO₂; **C2** = controle 2: BSA (0,6%) oócitos maturados *in vitro* por 5 horas em estufa Minitub e 19 horas em incubadora 5% CO₂; **B**= pré-MIV Butirolactona 10 µM / MIV BSA (0,6%); **BH**= pré-MIV Butirolactona 10 µM + HEPES 20 mM/ MIV BSA (0,6%); **BB**= pré-MIV BSA (0,3%) + Butirolactona 100 µM / MIV BSA (0,6%); **BBH**= pré-MIV BSA (0,3%) + Butirolactona 100 µM + HEPES 20 mM/ MIV BSA (0,6%).

A análise conjunta da maturação nuclear e citoplasmática revelou associação positiva ($P<0,05$) entre a porcentagem de oócitos que estavam imaturos quanto à conclusão da meiose (permaneciam em fase de GV) e quanto à distribuição predominante periférica das mitocôndrias no citoplasma (imaturas), ao final do cultivo de pré-MIV (C0 – 78,5%; B - 45,0%; BH - 42,2%; BB - 54,2%; BBH - 54,2%; Figura 7). Após o cultivo de MIV observou-se também associação positiva ($P<0,05$) entre a porcentagem de oócitos maduros quanto à conclusão da meiose (M II) e quanto à distribuição geral (maturas) das mitocôndrias no citoplasma (C1 - 64,5%; C2 - 56,1%; B - 52,6%, BH - 54,0; BB - 61,0%; BBH - 60,3; Figura 8).

Similarmente, a análise de associação entre maturação nuclear e citoplasmática avaliada pela distribuição dos grânulos corticais demonstrou associação positiva entre estas variáveis. Após o cultivo de pré-MIV, houve associação significativa ($P<0,05$) entre a porcentagem de oócitos imaturos quanto à conclusão da meiose (GV) e quanto à distribuição dispersa ou parcialmente dispersa dos GCs (C0 – 51,6%; B - 28,2%; BH - 25,3%; BB - 33,3%; BBH - 39,5%; Figura 9). Após MIV, observou-se associação positiva ($P<0,05$) entre a porcentagem de oócitos maduros quanto à progressão da meiose (M II) e quanto à redistribuição dos GCs em direção à periferia do citoplasma (C1 - 81,0%; C2 - 65,2%; B - 65,2%, BH - 48,6%; BB - 72,7%; BBH - 74,3%; Figura 10).

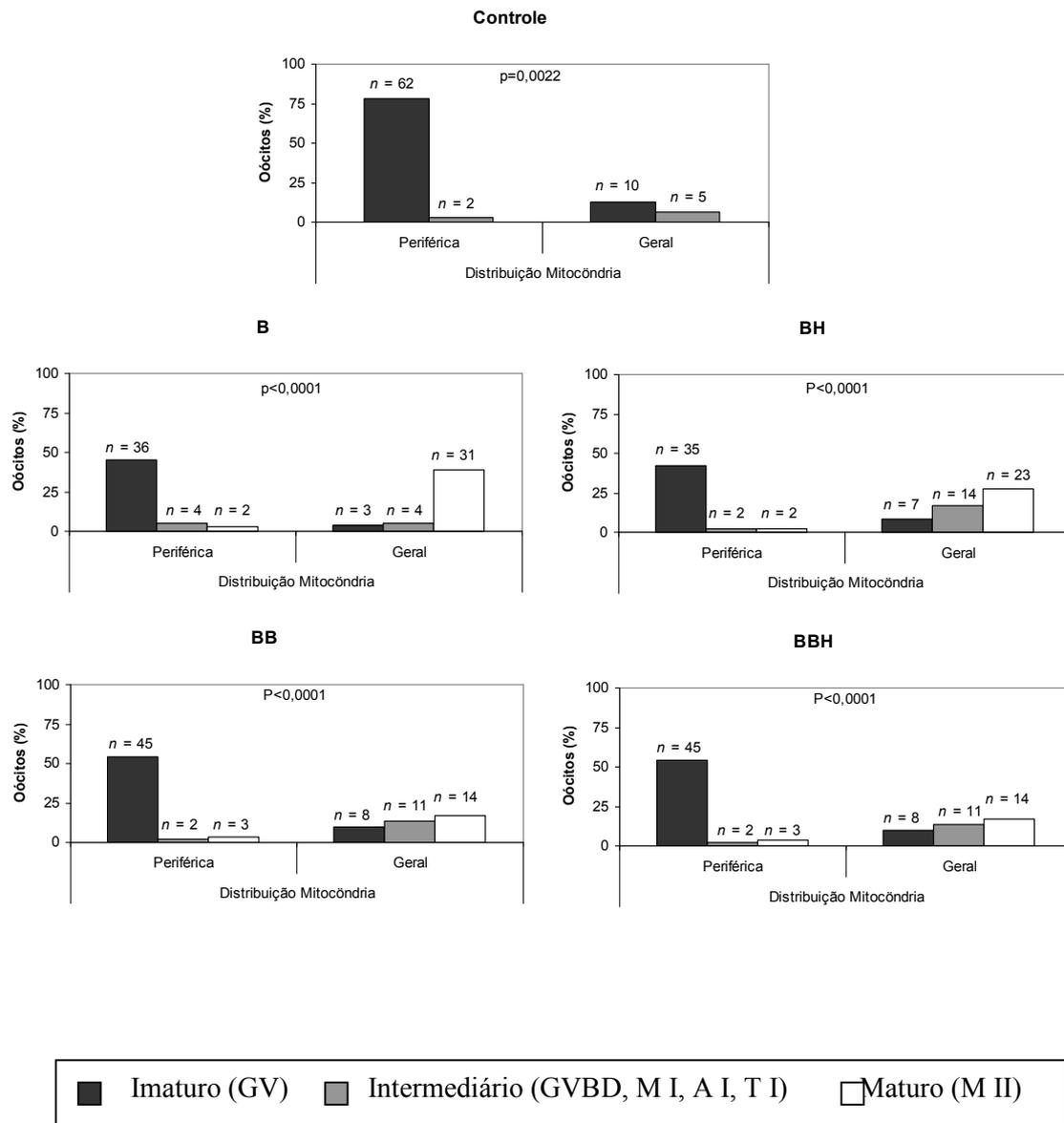


Figura 7. Associação entre maturação nuclear e distribuição citoplasmática das mitocôndrias em óocitos cultivados com butirrolactona I durante 24 horas.

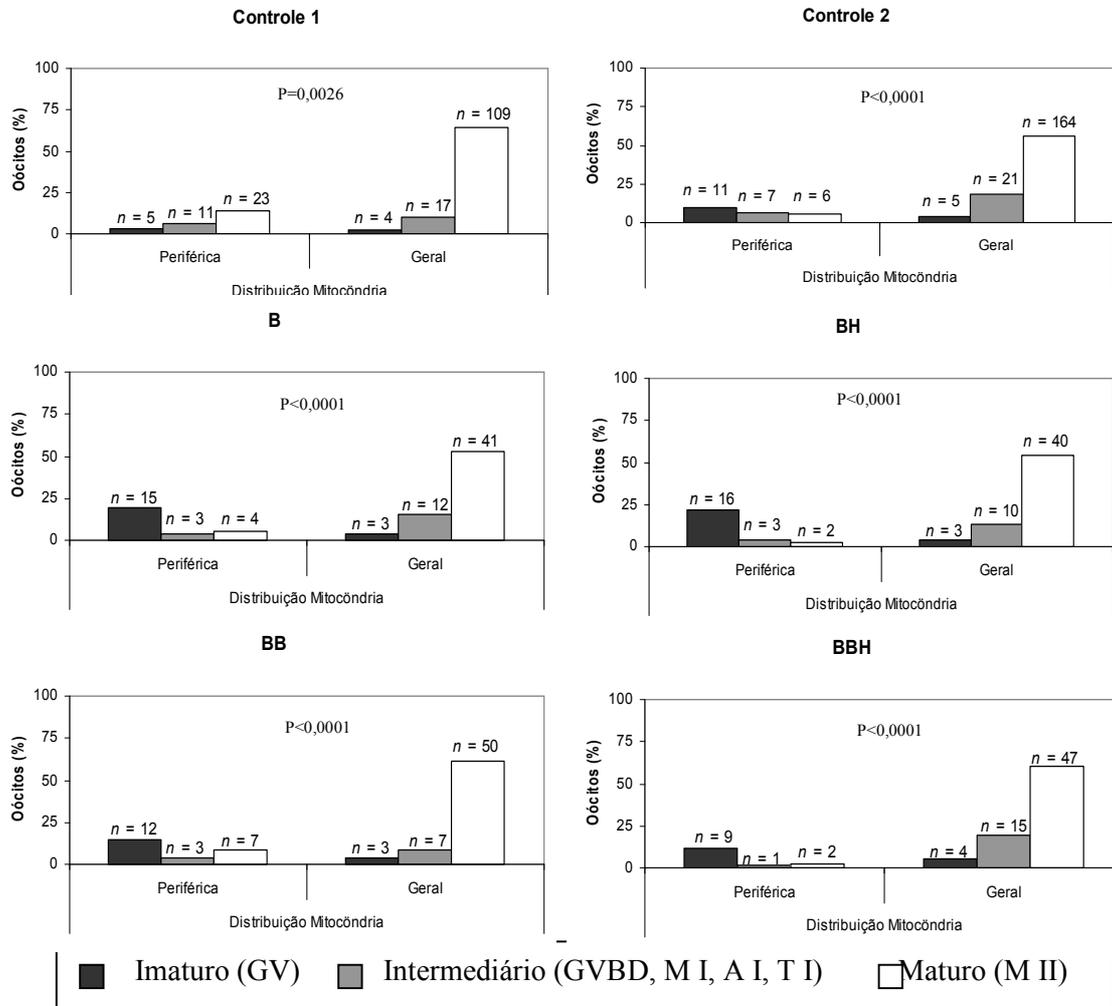


Figura 8. Associação entre maturação nuclear e distribuição citoplasmática das mitocôndrias em oócitos cultivados com butirolactona I durante 24 horas, seguido de cultivo de maturação *in vitro* por 24 horas (controle) ou 20 horas (oócitos pré-cultivados com BI-I).

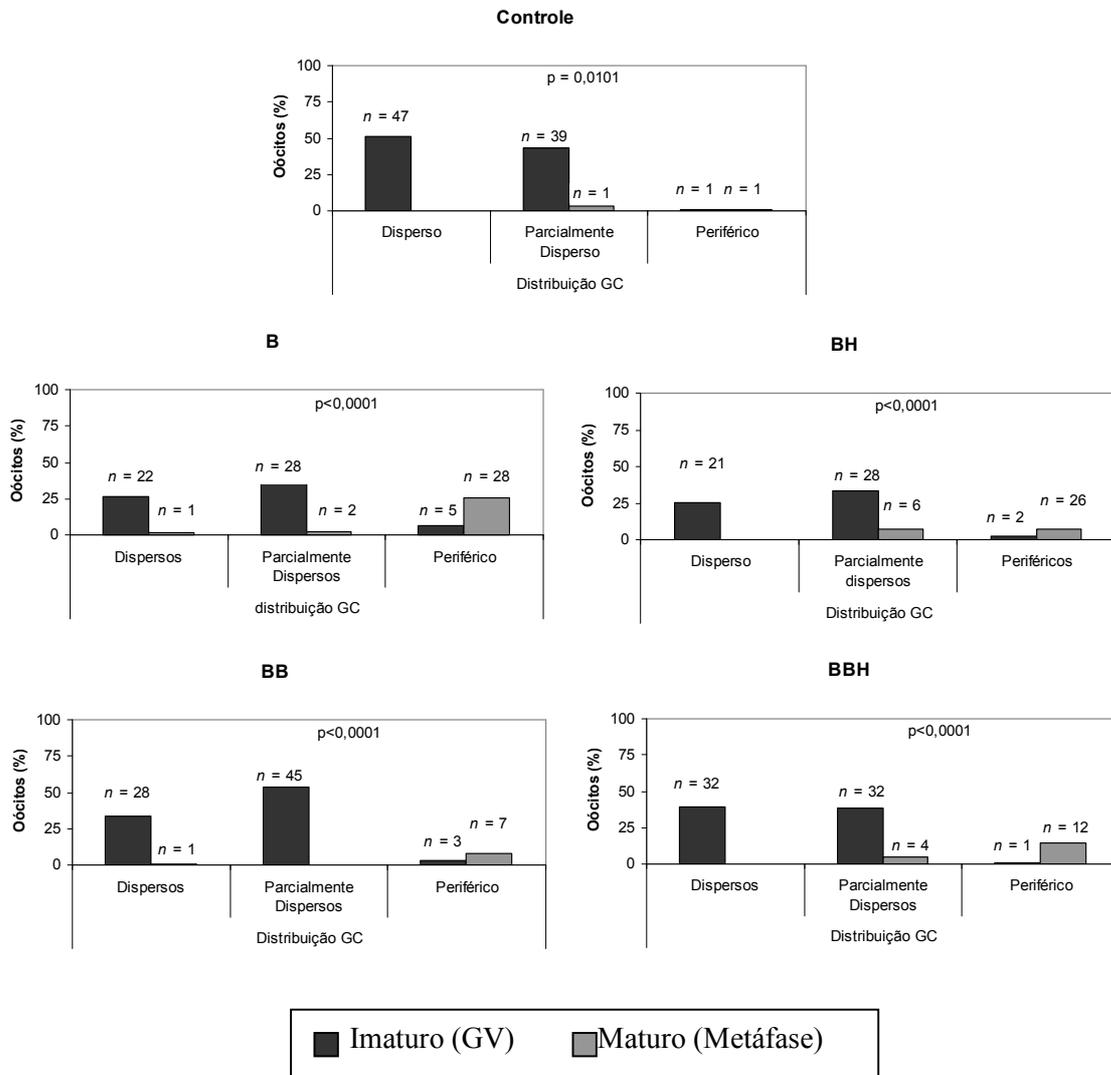


Figura 9. Associação entre maturação nuclear e distribuição citoplasmática dos grânulos corticais em óocitos cultivados com butirrolactona I durante 24 horas.

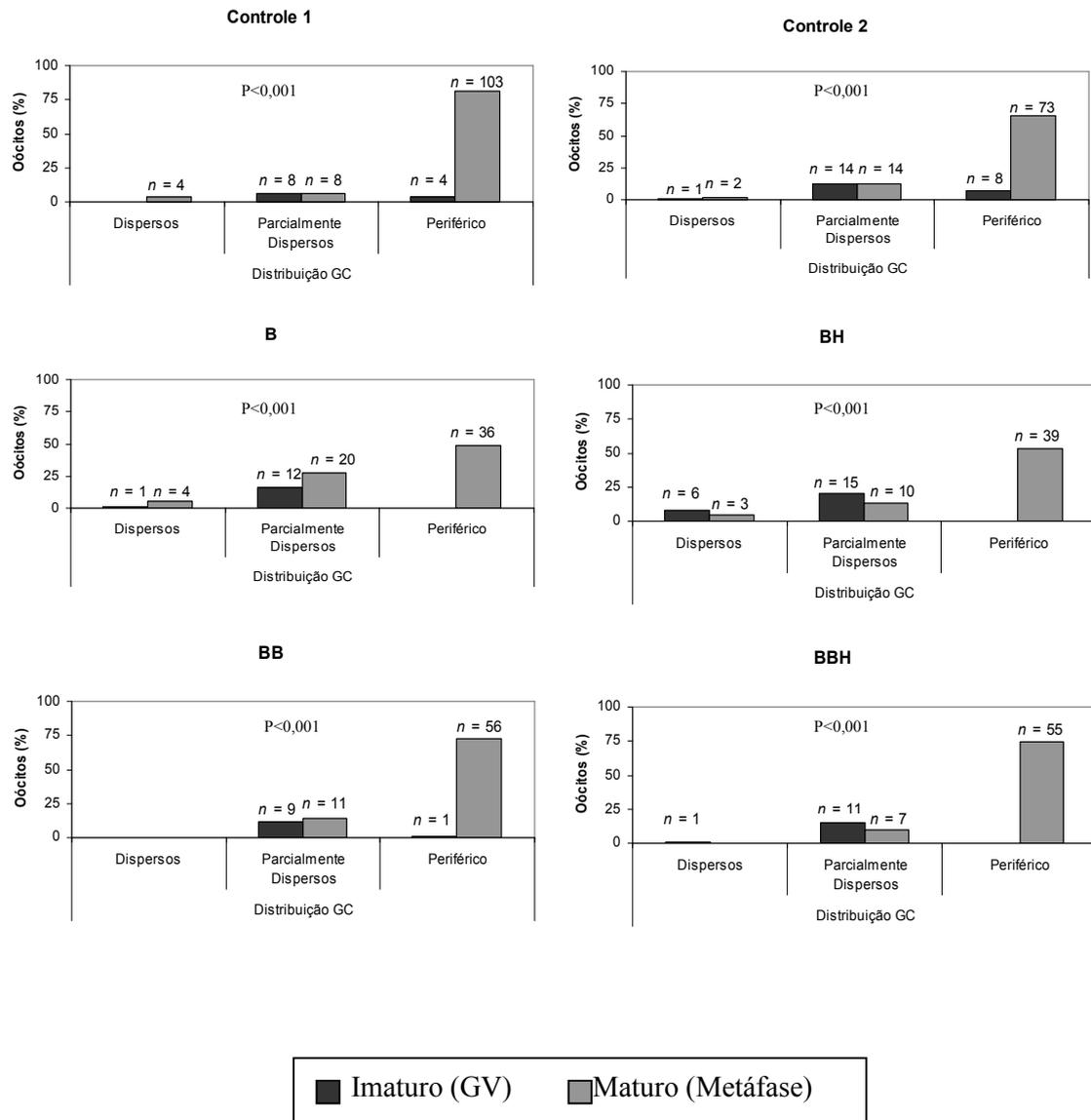


Figura 10. Associação entre maturação nuclear e distribuição citoplasmática dos grânulos corticais em oócitos cultivados com butirolactona I durante 24 horas, seguido de cultivo de maturação *in vitro* por 24 horas (controle) ou 20 horas (oócitos pré-cultivados com BI-I).

4.3. Experimento III

Para análise da fecundação em oócitos tratados com BI-I durante o transporte simulado, os oócitos foram maturados, fertilizados e analisados quanto à formação de pró-núcleos. A porcentagem de oócitos não fecundados foi menor ($P < 0,05$) no grupo C1 (21,1%) quando comparada aos demais grupos (38,2% - 49,2%; Tabela 4 e Figura 11). Desta forma, a porcentagem de oócitos penetrados por espermatozóides no grupo C1 (78,9%) foi superior ($P < 0,05$) à dos demais grupos (50,8% - 61,8%); destes oócitos, observou-se que a porcentagem de fecundação normal (2PN) foi superior ($P < 0,05$) no grupo C1 (78,9%) em comparação com os demais grupos (48,0% - 56,8%), não havendo diferença entre estes últimos ($P > 0,05$).

Não foram observados oócitos com mais de 2 PN nos grupos C1 e BB, cujos resultados foram inferiores ($P < 0,05$) aos observados em todos os outros grupos (2,9% - 8,4%), com exceção de C2 (1,4%; $P > 0,05$). A porcentagem de oócitos com +2PN foi elevada no grupo BH (8,4%), que foi semelhante ($P > 0,05$) ao grupo B (5,9%). Com relação ao grupo BBH, a porcentagem de oócitos com +2PN (2,9%) foi semelhante ($P > 0,05$) à observada nos grupos C2 (1,4%) e B (5,9%).

Observou-se correlação significativa ($R = 0,5$, $P < 0,05$) entre a porcentagem média de oócitos normalmente fertilizados (2PN) e a porcentagem de oócitos com disposição periférica de grânulos corticais (maturados) após MIV (Figura 12). Observou-se também correlação positiva ($R = 0,64$, $P < 0,05$) entre oócitos com mais de 2 pró-núcleos (+2PN) e oócitos com distribuição citoplasmática dispersa dos grânulos corticais após MIV (Figura 13).

Tabela 4- Desenvolvimento de pró-núcleos em oócitos submetidos ao bloqueio meiótico com butirolactona I durante transporte simulado por 24 horas, seguido de cultivo de maturação e fecundação *in vitro*.

Grupo	Oócitos (N)*	Não Fecundados (média % ± EPM)	Fecundados (média % ± EPM)	2 PN (média % ± EPM)	+ 2 PN (média % ± EPM)
C1	88	21,1 ± 0,8 ^b	78,9 ± 0,8 ^a	78,9 ± 0,6 ^a	0,0 ± 0,0 ^d
C2	95	41,9 ± 0,9 ^a	58,1 ± 0,9 ^b	56,8 ± 1,9 ^b	1,4 ± 1,0 ^{dc}
B	94	38,2 ± 0,5 ^a	61,8 ± 0,5 ^b	56,0 ± 0,2 ^b	5,9 ± 0,3 ^{ab}
BH	101	40,3 ± 0,2 ^a	59,8 ± 0,2 ^b	51,4 ± 0,0 ^b	8,4 ± 0,2 ^a
BB	95	48,2 ± 1,3 ^a	51,8 ± 1,3 ^b	51,8 ± 1,3 ^b	0,0 ± 0,0 ^d
BBH	99	49,2 ± 0,3 ^a	50,8 ± 0,6 ^b	48,0 ± 0,3 ^b	2,9 ± 0,2 ^{bc}

Letras diferentes na mesma coluna de oócitos imaturos ou maduros diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). *Oócitos analisados 18 horas pós-inseminação. **2PN**: formação de 2 pró-núcleos representando fecundação normal. **+2 PN**: formação de mais de 2 pró-núcleos representando polispermia.

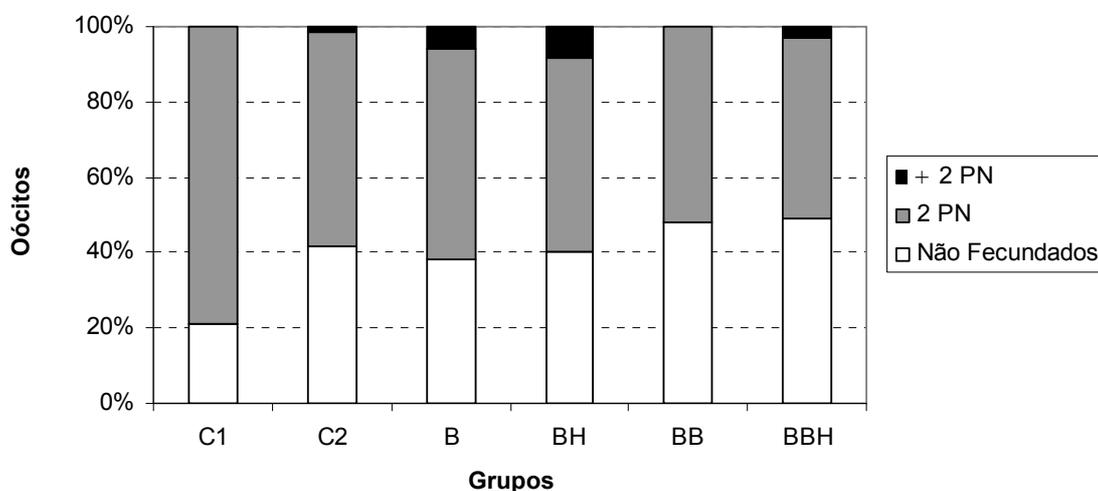


Figura 11. Formação de pró-núcleos 18 horas pós-inseminação de oócitos submetidos ao bloqueio meiótico com 10 ou 100 μ M de butirolactona I, seguido de maturação e fecundação *in vitro*.

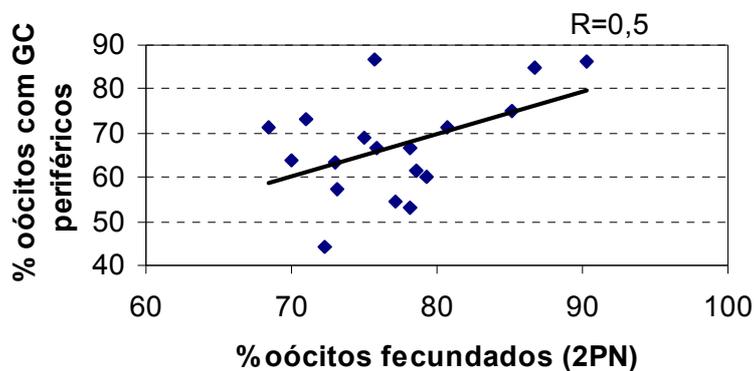


Figura 12. Correlação entre a porcentagem de óocitos que apresentaram fecundação normal (presença de 2 pró-núcleos) após 18 horas da inseminação e a porcentagem de óocitos com distribuição citoplasmática periférica (maturos) de grânulos corticais (GC) após a MIV.

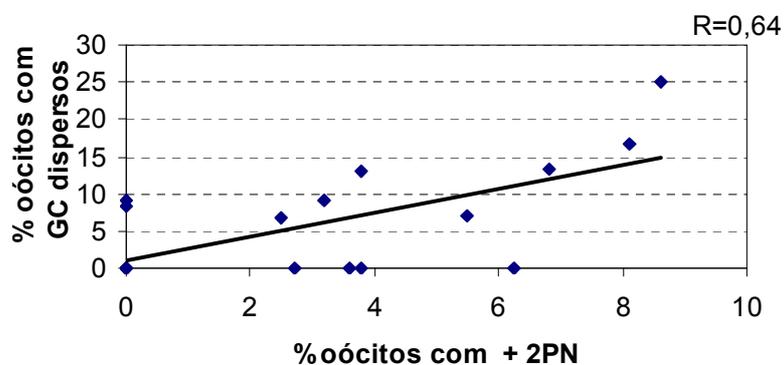


Figura 13. Correlação entre a porcentagem de óocitos que apresentaram formação de mais de 2 pró-núcleos (+2PN) após 18 horas da inseminação e a porcentagem de óocitos com distribuição dispersa (imaturos) de grânulos corticais (GC) após a MIV.

4.4. Experimento IV

Neste experimento foi avaliado o desenvolvimento embrionário após fecundação de oócitos tratados com BI-I durante o transporte. Os resultados podem ser visualizados na Figura 14. A taxa de clivagem foi similar ($P>0,05$) entre os grupos C1 (83,0%), C2 (68,6%) e B (67,7%), todavia C1 foi superior ($P<0,05$) e C2 e B foram similares ($P>0,05$) aos grupos BH (62,9%), BB (58,9%) e BBH (57,8%). De maneira semelhante, o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto em D7 foi similar ($P>0,05$) entre os grupos C1 (36,0%), C2 (27,4%) e B (27,6%), todavia C1 foi superior ($P<0,05$) e C2 e B foram similares ($P>0,05$) aos grupos BH (18,7%), BB (21,2%) e BBH (24,2%). O desenvolvimento embrionário em D8 foi similar ($P>0,05$) em todos os grupos (27,3 – 36,7%).

Para análise da qualidade embrionária através da determinação do número de células totais e apoptóticas em blastocistos no D8, os embriões foram subdivididos em dois subgrupos, de acordo com o grau de desenvolvimento: 1) blastocistos iniciais e blastocistos; e 2) blastocistos expandidos e eclodidos. Os dados estão apresentados na Tabela 5.

Com relação aos blastocistos iniciais e blastocistos, o número de células totais foi similar ($P>0,05$) entre os grupos (57,7 – 40,4), com exceção dos grupos C1 (57,7%) e B (40,4%; $P<0,05$). As menores taxas de apoptose foram observadas nos grupos C1 (9,9%) e BB (10,5%) que foram inferiores ($P<0,05$) ao grupo BH (22,1%), porém semelhantes aos demais grupos (13,2 – 17,1%; $P<0,05$). Embora diferentes entre si, os grupos BH e BB foram semelhantes ($P>0,05$) aos outros grupos tratados com BI-I (15,9, e 17,1%, respectivamente para B e BBH) e ao grupo C2 (13,2%).

Com relação aos blastocistos expandidos e eclodidos, não houve diferença entre os grupos ($P>0,05$) com relação ao número total de células (124,7 – 94,6) e a taxa de células apoptóticas (7,2 – 12,4%).

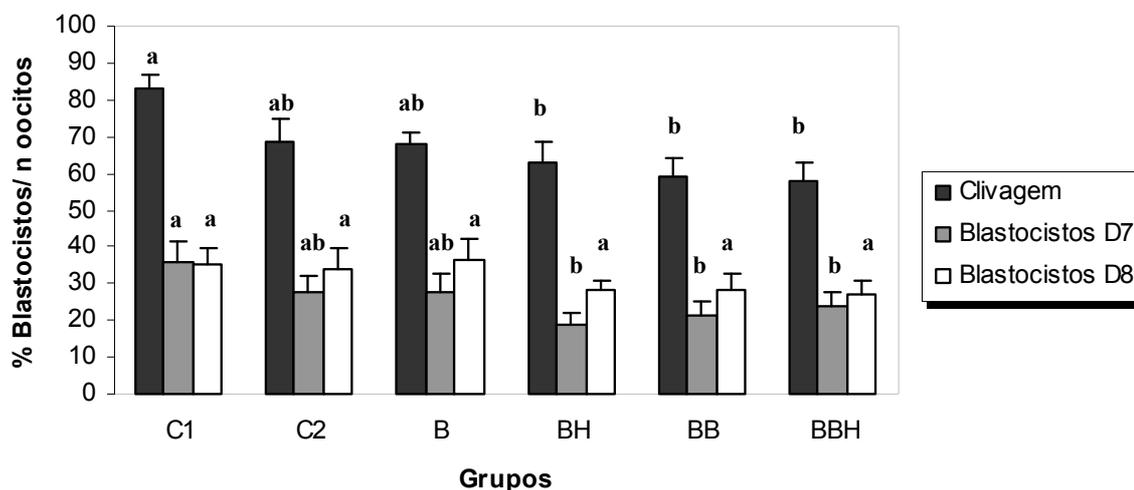


Figura 14. Desenvolvimento embrionário *in vitro* de embriões produzidos a partir de oócitos submetidos a bloqueio meiótico com 10 ou 100 μM de butirolactona I, seguido de maturação e fecundação *in vitro*.

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). **C1**= BSA (0,6%) oócitos submetidos a 24 horas MIV, **C2** = BSA (0,6%) oócitos maturados *in vitro* por 5 horas em estufa portátil Minitub e posteriormente submetidos a 19 horas de MIV em incubadora 5% CO_2 ; **B**= pré-MIV Butirolactona 10 μM / MIV BSA (0,6%); **BH**= pré-MIV Butirolactona 10 μM + HEPES 20 mM/ MIV BSA (0,6%); **BB**= pré-MIV BSA (0,3%) + Butirolactona 100 μM / MIV BSA (0,6%); **BBH**= pré-MIV BSA (0,3%) + Butirolactona 100 μM + HEPES 20 mM/ MIV BSA (0,6%).

Tabela 5. Número de células totais e fragmentação nuclear estimada pelo ensaio TUNEL em blastocistos no D8 de cultivo, produzidos a partir de oócitos submetidos a bloqueio meiótico com 10 ou 100 mM de butirolactona I, seguido de maturação e fecundação *in vitro*.

Tratamento	Blastocistos e blastocistos iniciais		Blastocistos expandidos e eclodidos	
	Células Totais (média % ± EPM) n	Apoptose (média % ± EPM)	Células Totais (média % ± EPM) n	Apoptose (média % ± EPM)
C1	57,7 ± 4,4 ^a (n = 28)	9,4 ± 1,4 ^b	124,7 ± 6,0 (n = 36)	7,2 ± 0,7
C2	50,4 ± 1,4 ^{ab} (n = 21)	13,2 ± 1,6 ^{ab}	105,1 ± 1,4 (n = 19)	8,2 ± 1,7
B	40,4 ± 4,3 ^b (n = 21)	15,9 ± 2,7 ^{ab}	96,0 ± 15,8 (n = 7)	9,1 ± 2,4
BH	42,0 ± 0,5 ^{ab} (n = 21)	22,1 ± 2,2 ^a	99,1 ± 9,7 (n = 10)	12,4 ± 1,4
BB	46,4 ± 3,4 ^{ab} (n = 19)	10,5 ± 0,3 ^b	96,4 ± 1,6 (n = 11)	8,6 ± 2,0
BBH	48,3 ± 3,6 ^{ab} (n = 23)	17,1 ± 2,9 ^{ab}	94,6 ± 3,9 (n = 8)	10,6 ± 0,9

Total de blastocistos iniciais, blastocistos (BI), blastocistos expandidos (BI exp.) e blastocistos eclodidos (BI ecl.) produzidos relativo ao número total de oócitos. **C1**= BSA (0,6%) oócitos submetidos a 24 horas MIV, **C2** = BSA (0,6%) oócitos maturados *in vitro* por 5 horas em estufa portátil Minitub e posteriormente submetidos a 19 horas de MIV em incubadora 5% CO₂; **B**= pré-MIV Butirolactona 10 µM / MIV BSA (0,6%); **BH**= pré-MIV Butirolactona 10 µM + HEPES 20 mM/ MIV BSA (0,6%); **BB**= pré-MIV BSA (0,3%) + Butirolactona 100 µM / MIV BSA (0,6%); **BBH**= pré-MIV BSA (0,3%) + Butirolactona 100 µM + HEPES 20 mM/ MIV BSA (0,6%). Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

5. DISCUSSÃO

O bloqueio da meiose é uma importante ferramenta para que se possam estudar os possíveis fatores envolvidos na indução da “capacitação” após a remoção dos oócitos do ambiente folicular, visando obter um tempo adicional para aquisição da completa competência do oócito. Inibidores de cinases dependentes de ciclinas (cdk) como a butirolactona I (KUBELKA et al., 2000, ADONA et al., 2008) e roscovitina (MERMILLOD et al. 2000) têm sido usados com sucesso para bloquear a meiose. Nesse trabalho foi proposta a utilização da BI-I durante o transporte simulado de oócitos, visando obtenção de maior competência e melhor preservação da qualidade desses oócitos transportados e, conseqüentemente, maior número de blastocistos de boa qualidade.

KUBELKA et al. (2000) e ADONA e LEAL (2004) relataram que o efeito de inibidores como BI-I é dose- e tempo-dependente e que na presença de macromoléculas como BSA é necessária a utilização de concentrações elevadas, provavelmente pelo fato da BI-I se ligar ao BSA, o que reduz sua disponibilidade no meio. No presente trabalho, o mais eficiente efeito de inibição da meiose durante o transporte foi obtido quando se utilizou BI-I em maior concentração (100 μ M) e na presença de BSA durante 24 horas, quando comparada à utilização de 10 μ M sem o BSA. Em trabalho recente, ADONA et al. (2008) relataram que na ausência de BSA, a BI-I foi igualmente eficiente em altas ou baixas concentrações, inclusive na concentração de 10 μ M utilizada no presente trabalho. Apesar de ter sido utilizado neste trabalho o protocolo recomendado por estes autores, os resultados não puderam ser repetidos com a mesma eficácia. Possivelmente as diferenças entre procedimentos nos diferentes experimentos possam ter contribuído para este resultado, contudo este fator não pôde ser identificado até o presente momento.

Foi também demonstrado que, além do BSA, outros componentes presentes no meio podem alterar a atividade da BI-I. Hashimoto et al. (2002) verificaram aumento da capacitação de oócitos pré-cultivados com BI-I em meio

suplementado com soro fetal bovino em baixa concentração de O₂. Portanto, parece provável que a menor competência oocitária observada neste trabalho pode ser devida à alta concentração de O₂ atmosférico presente durante a simulação de transporte em estufa portátil Minitub, ou ainda à não-inclusão no meio de hormônios ou outros fatores presentes no soro.

No presente trabalho, foi utilizado HEPES em dois grupos experimentais (BH e BBH), objetivando-se a melhor preservação das características do meio de pré-maturação durante o transporte, situação na qual os oócitos permaneceram em criotubos lacrados expostos à atmosfera ambiente. Todavia, esta substância alterou o meio de pré-maturação, pois induziu uma alta taxa de partenogênese (grupo BH). Alguns efeitos indesejados do HEPES incluem o aumento do pH intracelular e alterações na incorporação de substratos carbono no RNA e/ou DNA, o que pode comprometer a aquisição da competência dos oócitos (HASHMOTO et al., 2003). Estas alterações podem estar associadas à inibição do reinício da meiose, erros no fuso meiótico e anormalidades de segregações cromossômicas (HAMAGUCHI, 1995). Tais efeitos podem explicar a partenogênese observada, bem como sugerir possíveis prejuízos na aquisição da competência oocitária, já que a ativação partenogênica inativa o MPF (KUBELKA et al., 2000; KIKUCHI et al., 2000; ABRIEU et al., 2001; LEDAN et al., 2001), assim também prejudicando a maturação nuclear do oócito.

Adicionalmente, outros estudos já demonstraram a indução de partenogênese em oócitos suínos e bovinos cultivados com butirolactona, roscovitina, inibidores de fosforilação e outros inibidores de síntese protéica, como por exemplo a cicloheximidina (YANG *et al.*, 1994; TAKAHASHI *et al.*, 1996). Muito embora a ocorrência de partenogênese tenha sido menor nos grupos sem HEPES (B e BB) em comparação com os grupos suplementados com HEPES (BH e BBH), não se pode deixar de supor que a ação do HEPES associado à butirolactona possa ter alterado o fuso meiótico durante a maturação a ponto de estimular a ativação partenogênica, provavelmente um efeito dependente da concentração e do tempo de exposição a essas substâncias.

Após remoção do meio com bloqueador da meiose e cultivo de maturação *in vitro*, os oócitos pré-cultivados em menor concentração de BI-I (grupos B e BH) obtiveram menor taxa de conclusão da meiose, possivelmente devido ao bloqueio ineficiente, o que possivelmente acarretou prováveis alterações nos microtúbulos e/ou proteínas importantes, diminuindo a competência do oócito.

Foi anteriormente demonstrado que, após remoção do meio com inibidores, há freqüentemente uma aceleração da progressão da meiose durante o cultivo de maturação (LAGUTINA et al., 2002; HASHIMOTO et al., 2002; ADONA e LEAL, 2004), independentemente da concentração de BI-I utilizada. Isto pôde ser demonstrado no presente trabalho pela porcentagem de oócitos que atingiram MII nos grupos com maior concentração de BI-I terem sido semelhantes a porcentagem de oócitos dos grupos controles mesmo com apenas 20 horas de MIV. Por outro lado, os oócitos dos grupos com menor concentração de BI-I também passaram por 20 horas de MIV mas apresentaram uma porcentagem de oócitos em MII inferior aos controles. A explicação provável para este fato é que o bloqueio meiótico não inibe completamente a síntese e fosforilação de proteínas ou a transcrição (VIGNERON et al., 2004, LEQUARRE et al., 2004). Embora a MAPK seja indiretamente inibida durante o bloqueio com BI-I (KUBELKA et al., 2000), é rapidamente ativada após a remoção do meio contendo o inibidor (WU et al., 2002). Estes resultados indicam que durante o bloqueio possa haver acúmulo de fatores necessários à progressão meiótica, os quais podem permitir a progressão da maturação citoplasmática, embora a meiose esteja estacionada.

Os resultados do presente trabalho suportam a hipótese acima mencionada, pois durante o bloqueio com BI-I, foi observada progressão da maturação citoplasmática estimada pela distribuição e potencial de membrana mitocondrial. De maneira semelhante, WU et al. (2002) também observaram migração de mitocôndrias em oócitos de suínos bloqueados. A migração desta organela pode não ser completamente controlada pelo MPF ou pela MAPK e pode ser considerada independente da maturação nuclear, isto é, outra(s) via(s) pode(m) participar desse controle. De fato, sabe-se que a migração das

mitocôndrias é mediada pelos microtúbulos usados por proteínas motoras que geram movimento das organelas no interior da célula (SUN et al., 2001; ALBERTS et al., 1997).

A organização das mitocôndrias e o nível de ATP são indicativos de qualidade dos oócitos (STOJKOVIC et al., 2001), assim como o potencial de membrana mitocondrial é um bom indicativo de integridade e funcionalidade destas organelas (LIU et al., 1999). O uso de inibidor de cinases pode causar alterações estruturais nas mitocôndrias, principalmente quando oócitos são expostos à Roscovitina ou BI-I por períodos superiores a 44 horas (LONERGAN, 2003). Contrariamente aos dados deste autor, no presente trabalho foi verificado alto potencial de membrana mitocondrial em todos os grupos após pré-MIV e após MIV, embora os oócitos tenham sido expostos à BI-I durante apenas 24 horas, período que pode não ter sido capaz de promover alteração de estrutura mitocondrial.

Neste trabalho não foi observada redistribuição dos grânulos corticais em direção ao córtex do oócito durante o bloqueio da meiose. Desta forma, com base especificamente na dinâmica desta organela, os resultados não demonstraram melhoria na maturação citoplasmática, a qual permaneceu estacionada. O bloqueio desta migração sugere um envolvimento direto ou indireto do MPF, que quando inativado pela BI-I, não induz a dinâmica do citoesqueleto (BRUNET e MARO, 2005), levando a imobilidade dos microfilamentos responsáveis pelo movimento de organelas no interior do citoplasma celular (WESSEL et al., 2002).

O padrão de distribuição dos grânulos corticais durante o bloqueio da meiose foi condizente com dados de outros trabalhos descritos na literatura (VELILLA et al., 2004, COY et al. 2005; ADONA et al., 2008). No entanto, ao contrário de alguns estudos que demonstraram que, independente da concentração de BI-I utilizada, a migração dos grânulos corticais no pós-bloqueio meiótico não é alterada, observou-se que houve migração dos grânulos corticais para a periferia do oócito apenas nos grupos BH e BB. A migração dos grânulos corticais é um indicativo de que os microfilamentos não foram afetados pelo

bloqueio meiótico (CONNORS et al., 1998; SUN et al., 2001a). Assim, nos grupo B, BBH e no grupo C2, o tempo de transporte e a ineficiente ação de BI-I podem ter prejudicado diretamente a função dos microfilamentos por uma desestabilização do MPF ou de outras proteínas de fosforilação. Embora alguns estudos prévios não tenham demonstrado alteração de microtúbulos e microfilamentos após o bloqueio com BI-I (KIM et al., 2000; BRUNET e MARO, 2005), outros demonstram que possíveis alterações causadas a essas estruturas e diretamente nos grânulos corticais podem estar relacionadas ao longo tempo de exposição do oócito a BI-I, mas não a concentração utilizada (FAIR et al., 2002; LONERGAN et al., 2003). Portanto, não se sabe ao certo o tempo máximo para que a utilização dessas drogas resulte apenas em resultados benéficos, para isso mais estudos moleculares devem ser realizados.

In vivo, é no ambiente folicular que o oócito atinge gradual e sequencialmente a competência para completar a meiose, sendo que isto depende de modificações moleculares e estruturais que ocorrem durante a maturação citoplasmática (GILCHRST e THOMPSON, 2007), isso representa a íntima associação entre a maturação citoplasmática e meiótica. Nesse trabalho, pôde-se verificar a associação existente entre as transformações citoplasmáticas e nucleares, pois independente do tratamento com BI-I, a maioria dos oócitos que concluíram a meiose após o cultivo de maturação também apresentaram progressão da maturação citoplasmática pela distribuição dos GC e mitocôndrias.

A competência dos oócitos foi testada pela análise da fecundação e subsequente formação de pró-núcleos e desenvolvimento embrionário. Anormalidades na competência oocitária podem induzir erros na formação dos pró-núcleos, como assincronia, poligamia ou pré-ativação de citocinesina, e levam a interrupção do desenvolvimento embrionário (GORDON, 1994). A assincronia se dá quando se verifica um pró-núcleo de tamanho muito maior que o outro. A poligamia é verificada quando se identifica mais de 2 PNs ou 2PNs e 1 cabeça de espermatozóide, em decorrência de polispermia. Já na pré-ativação ocorre uma divisão simétrica do ooplasma com PNs em uma ou nas duas células.

Foi verificada menor porcentagem de oócitos fecundados em todos os grupos com oócitos mantidos em estufa portátil durante o transporte simulado. Assim, é provável que o tempo e as condições de transporte tenham prejudicado a aquisição da competência citoplasmática dos oócitos e mesmo a pré-maturação com BI-I não possibilitou a melhora nessa competência.

Vários estudos demonstram que, *in vitro*, a taxa de oócitos não fecundados gira em torno de 15 a 20% (ROH et al., 2002; AVERY et al., 2003; SENBON et al., 2004; ALOMAR et al., 2008), semelhante ao observado no grupo controle (C1) deste experimento. Todavia, a taxa de oócitos não fecundados foi muito superior (38 – 49%) nos oócitos mantidos em estufa portátil durante o transporte simulado, tratados com BI-I ou não (grupo controle C2). Algumas hipóteses que podem explicar este fato incluem: número insuficiente de GCs, endurecimento prematuro da zona pelúcida, alteração na zona pelúcida e maturação citoplasmática alterada (Ducibella, 1996). O endurecimento prematuro da zona pelúcida pode ter ocorrido nesse experimento, já que após a pré-MIV grande porcentagem dos oócitos do grupo B e BH já apresentavam GC na periferia; pode-se supor que tenha ocorrido alguma alteração citoplasmática capaz de ativar a exocitose dos GCs antes mesmo da fusão do espermatozóide com o oócito, levando a modificações na zona pelúcida que impediram a entrada do espermatozóide. No entanto, oócitos dos grupos C2, BB e BBH não apresentaram precoce migração dos GCs, mas também apresentaram alta taxa de oócitos não fecundados; portanto, outras alterações na zona pelúcida ou na maturação citoplasmática devem ter ocorrido durante o tempo de transporte.

Nesse trabalho foi encontrada uma pequena porcentagem de oócitos com maior número de pró-núcleos (> 2PN), com exceção dos grupos C1 e BB, que não apresentaram alteração da fecundação. Alguns autores consideram normal uma taxa média de 5% de zigotos que apresentam mais de dois pró-núcleos, também denominada taxa de polispermia (ROH et al., 2002; AVERY et al., 2003; SENBON et al., 2004; ALOMAR et al., 2008). A taxa encontrada pelos resultados desse trabalho está abaixo da descrita por estes autores, mas isso possivelmente seja

explicado por diferentes meios de fertilização utilizados ou mesmo por diferentes técnicas de coloração utilizadas para esta avaliação (Hoeschst ou Aceto-Orceína, remoção ou não da zona pelúcida).

Foi encontrado >2PN nos grupos C2, B e BBH, esse aumento na formação de pró-núcleos pode estar associado à falha dos GC em bloquear a polispermia, sendo que esses grupos foram os que apresentaram menor número de oócitos com GC periféricos após a MIV, ou seja, muitos GC ainda encontravam-se imaturos (dispersos ou parcialmente dispersos).

A correlação entre oócitos com formação de mais de 2 pró-núcleos com oócitos que apresentaram seus grânulos corticais imaturos (dispersos ou parcialmente dispersos) após MIV foi provado pelo teste de correlação realizado, que apresentou um resultado significativo.

No oócito competente há dois mecanismos de bloqueio para assegurar a fecundação por apenas um espermatozóide. O primeiro ocorre pela despolarização da membrana plasmática oocitária causada pela fusão do primeiro espermatozóide, prevenindo temporariamente a penetração de outros. O segundo bloqueio à polispermia, que é o mais importante em mamíferos, se dá pela extrusão dos grânulos corticais, constituindo-se de um evento permanente e causado por ondas de cálcio. A elevação da concentração do cálcio intracelular induz a fusão da membrana dos grânulos corticais com o ooplasma e o conteúdo dos grânulos corticais é liberado para o espaço perivitelíneo. As enzimas liberadas causam alterações moleculares na zona pelúcida que fica mais enrijecida e evita entrada de mais espermatozoides (reação cortical) (SUN et al, 2003). Os resultados deste trabalho reforçam a importância da maturação dos grânulos corticais para permissão de uma fecundação normal, pois foi verificado um índice de correlação significativo entre oócitos que apresentaram fecundação normal e oócitos com GC periféricos após a maturação.

Defeitos na maturação oocitária podem possivelmente ser causados por inadequada maturação nuclear ou citoplasmática, ou mesmo por uma falha em ambas (YANG et al., 1998). Esses defeitos podem gerar alterações na rede de

microtúbulos e proteína cinases, que conseqüentemente se refletem em alterações da compartimentalização do ooplasma e na distribuição de organelas como as mitocôndrias e grânulos corticais, o que pode levar à polispermia. No caso da distribuição dos grânulos corticais ser alterada, pode ocorrer polispermia e, assim, são formados fusos extras ou multipolares, resultando na falha da segregação de cromossomos durante a divisão celular, o que geralmente cessa o desenvolvimento embrionário (SUN et al, 2003). A inabilidade das mitocôndrias em aumentar e/ou acumular ATP tem sido ligada ao desenvolvimento anormal ou ao bloqueio do desenvolvimento embrionário (STEUERWALD et al., 2000), uma vez que blastômeros embrionários desprovidos de uma população suficiente de mitocôndrias para produção de ATP podem tornar-se disfuncionais e fragmentados (CUMMINS, 2004).

Baseado nessas informações seria esperado que oócitos dos grupos tratados que apresentaram maiores taxas de maturação e de fecundação resultassem em maiores taxas de blastocistos de boa qualidade. Todavia, essa associação não pôde ser verificada pela análise da taxa de blastocistos no sétimo dia de desenvolvimento, já que os grupos BB e BBH, os quais apresentaram maior número de oócitos com meiose concluída e com boa maturação citoplasmática quanto à distribuição das organelas analisadas, apresentaram menor taxa de blastocistos. Além destes grupos, o atraso no desenvolvimento embrionário foi verificado também no grupo BH.

Em muitos estudos realizados com BI-I, não foram observados efeitos negativos no desenvolvimento embrionário (MOTLIK et al., 1998; IMAI et al., 1999; KUBELKA et al., 2000; LONERGAN et al., 2000, ADONA et al., 2008), o que se repetiu neste experimento com relação à taxa de blastocistos após 8 dias de desenvolvimento, mas não ocorreu no sétimo dia de desenvolvimento. LONERGAN et al. (2002) mostraram que elevadas concentrações de BI-I, da ordem de 150 μ M, causam efeitos adversos no desenvolvimento embrionário, possivelmente por um efeito tóxico deste inibidor. Todavia, no presente estudo foram utilizadas doses inferiores àquelas citadas por estes autores e

provavelmente, devido a isto, não foram observados efeitos prejudiciais. Além do mais, mudanças nas condições de cultura com inibidores de cinases, qualidade de oócitos utilizados e a sensibilidade desses a toxicidade da BI-I podem alterar o efeito de alguns desses inibidores (HASHIMOTO et al.,2002).

A velocidade de clivagem e de desenvolvimento embrionário é considerada um indicativo de qualidade do embrião. Embriões de desenvolvimento mais rápido resistem melhor às agressões do ambiente, resultam em maior taxa de prenhez e mais bezerros a termo do que aqueles mais lentos (VAN SOOM et al.,1997). Isso se explica pelo fato das primeiras clivagens estarem relacionadas à poliadenilação de vários genes importantes para o desenvolvimento do embrião, sendo diferente a expressão desses genes em embriões mais rápidos e mais lentos (BREVINI-GANDOLFI et al.,2002; LONERGAN et al., 2000; FAIR et al., 2002; GUTIERREZ, 2004).

Verificou-se neste trabalho um atraso do desenvolvimento embrionário até o sétimo dia de cultivo em oócitos tratados com BI-I, todavia isto foi revertido no oitavo dia. Assim, a BI-I possibilitou um tempo prolongado de transporte de oócitos sem afetar a taxa final de produção de blastocistos. Já foi demonstrado que o atraso no desenvolvimento embrionário pode ser controlado através de suplementos adicionados ao meio de cultura (RIZOS et al., 2003). Isso pode ter ocorrido nesse trabalho, já que ao final do cultivo foi obtida uma taxa de blastocistos de boa qualidade em todos os grupos, possivelmente pelo cultivo ter proporcionado boas condições aos embriões.

Devido ao atraso no desenvolvimento, foram obtidos muitos blastocistos iniciais no oitavo dia de desenvolvimento. Desta maneira, esperando encontrar diferenças na qualidade embrionária de acordo com VAN SOOM et al. (2002) que observaram aumento na taxa de apoptose e redução na mitose com o avançar do desenvolvimento embrionário *in vitro*, foi feita análise em separado dos blastocistos em início de desenvolvimento (blastocistos iniciais e blastocistos) e dos mais adiantados (blastocistos expandidos e eclodidos). A taxa de apoptose e o número de blastômeros foram determinados como marcadores da qualidade

embrionária e, de acordo com estes parâmetros de avaliação, não foi observada diferença de qualidade entre os grupos ao final do oitavo dia de desenvolvimento. A apoptose é um processo natural no desenvolvimento embrionário de mamíferos e ocorre tanto *in vivo* quanto *in vitro*, somente começando em estádios diferentes, ou seja, em embriões de 21 células e de 6 células, respectivamente (NEUBER et al., 2002; GORRET et al., 2003). A apoptose parece ser um eficiente controle na população de células que não são mais úteis ao embrião. Porém, apesar de ainda incerta, deve haver uma proporção ideal de células apoptóticas e células viáveis, por isso considera-se que quanto maior o número de células e menor a taxa de apoptose, melhor a qualidade do embrião.

A taxa de apoptose no embrião está diretamente relacionada à qualidade de maturação do oócito, sendo que o sucesso de desenvolvimento embrionário na pré-implantação é dependente do tipo e quantidade de estoque materno de RNAm e proteínas armazenados durante a maturação citoplasmática (GADOLFI, 2001). Moléculas relacionadas com a sobrevivência celular, quando acumuladas inadequadamente durante a oôgenese, podem induzir um desequilíbrio, tendo como resultado a morte embrionária precoce (METCALFE et al., 2003). Como a mitocôndria está diretamente ligada com a morte celular programada, estudos mostraram que a injeção intracitoplasmática de mitocôndrias pode ser suficiente para salvar um oócito da fragmentação celular (ACTON et al., 2004). A associação entre maturação e qualidade embrionária pode explicar a diferença encontrada na taxa de apoptose e no número total de células dos embriões mais atrasados, observando que no grupo BB apesar de ter ocorrido um maior atraso no desenvolvimento dos embriões esses apresentaram melhor qualidade. Por outro lado, o grupo B foi o único que apresentou blastocistos iniciais e blastocistos de menor qualidade quanto ao número de células.

Verificou-se também pelos resultados apresentados que o grupo BH apresentou blastocistos iniciais com maior taxa de apoptose. O HEPES foi utilizado para controlar variações de pH, já que variações de pH no meio de cultivo, dependendo da amplitude, podem resultar em diminuição dos índices de

fecundação e produção de blastocistos pela a viabilidade celular ser afetada (IC et al., 2001). No entanto, sabe-se que o HEPES pode ser tóxico e causar fragmentação de células nas primeiras divisões do embrião, por isso muitos meios livres de HEPES são usados para manipulação de oócitos e embriões em ar atmosférico, preferindo-se o uso de bicarbonato (IWASAKI et al., 1999; MORGIA et al., 2006). Assim, sugere-se que o HEPES possa ter causado a fragmentação no grupo com menor concentração de BI-I, já que a ineficiência do bloqueio com a menor concentração levou a uma maturação citoplasmática incompleta neste grupo.

Como os blastocistos iniciais apresentaram maior taxa de apoptose e menor número de células, poderia-se esperar que fossem embriões atrasados de menor qualidade. No entanto, os blastocistos do grupo BB se apresentaram de melhor qualidade, no sétimo e oitavo dia de desenvolvimento, mesmo sendo o grupo que obteve maior atraso no desenvolvimento inicial. Assim, percebe-se que a utilização da maior concentração de BI-I pode ter um efeito contraditório de início, mas não prejudica a porcentagem final de blastocistos e nem sua qualidade, podendo ser útil para meios de transporte a longas distâncias.

6. CONCLUSÕES

A Butirolactona I na concentração de 100 μ M viabiliza o transporte prolongado de oócitos bovinos por evitar grandes alterações na competência do oócito e resultar em uma adequada taxa de blastocistos de boa qualidade.

Considerando a migração das mitocôndrias em oócitos que tiveram a meiose bloqueada pela Butirolactona I, pode-se afirmar que o uso de Butirolactona I durante o transporte possibilita uma melhor maturação citoplasmática para suportar o completo desenvolvimento do oócito.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de bloqueadores da maturação nuclear durante o transporte de oócitos obtidos a campo por OPU com o intuito de preservar e permitir um melhor desenvolvimento citoplasmático e uma melhor competência desses oócitos é uma ferramenta que pode trazer avanços na produção *in vitro* de embriões bovinos. Neste trabalho verificamos algumas vantagens do uso de BI-I, que quando utilizada na concentração de 100 μ M possibilitou melhoras na maturação citoplasmática e no desenvolvimento de blastocistos de boa qualidade mesmo após 48 horas de preparo desses oócitos antes de serem fecundados. Assim pode-se supor que um transporte longo em condições adequadas é possível pela preservação da qualidade deste oócito com butirolactona-I. No entanto há ainda muito que estudar sobre esses inibidores, e assim identificar o melhor químico, a melhor dose e o tempo máximo para que esses não acabem por causar alterações celulares que prejudiquem o desenvolvimento embrionário.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIEU, A.; Dorée, M.; Fisher, D. The interplay between cyclin-B–Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. **Journal of Cell Science**, v.114, p.257-267, 2001.

ABBOTT, A.L.; DUCIBELLA, T. Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. **Frontiers in Bioscience**, v.6, p.792-806, 2001.

ADONA, P.R.; PIRES, P.R.L.; QUETGLAS, M.D.; SCHWARZ, K.R.L.; LEAL, C.L.V. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Animal Reproduction Science**, v. 108 (1-2), p. 49-65, 2008.

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

ADONA, P.R.; 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.

ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD. *Biologia Molecular da Célula*. Tradução de Amauri Braga Simonetti. **Artes Medicas**, 3ª ed. Porto Alegre, p.1294, 1997.

ALOMAR, M.; TASIAUX, H.; REMACLE, S.; GEORGE F.; PAUL D., DONNAY, I. Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.48–61, 2008.

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

ARRIS, C.E.; BOYLE, F.T.; CALVERT, A.H.; CURTIN, N.J.; ENDICOTT, J.A.; GARMAN, E.F.; GIBSON, A.E.; GOLDING, B.T.; GRANT, S.; GRIFFIN, R.J.; JEWSBURY, P.; JOHNSON, L.N.; LAWRIE, A.M.; NEWELL, D.R.; NOBLE, M.E.M.; EDWARD, A.; SAUSVILLE, E.A.;SCHULTZ, R., YU, W. Identification of novel purine and pyrimidine cyclin-dependent kinase inhibitors with distinct molecular interactions and tumor cell growth inhibition profiles. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 2797-2804, 2000.

BRAÑA, M.F.; GARCÍA, M.L.; LÓPEZ, B.; DE PASCUAL; TERESA, B., RAMOS, A.; POZUELO, J.M.; DOMÍNGUEZ, M.T. Synthesis and biological evaluation of analogues of butyrolactone I and molecular model of its interaction with CDK2. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.2, p.1864-1871, 2004.

BARRETTO, L.S.S.; CAIADO CASTRO, V.S.D.; GARCIA, J.M.; MINGOTI, G.Z. Role of roscovitine and IBMX on kinetics of nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.202–207, 2007.

BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. **Theriogenology** v. 60, p.1679-1690, 2003.

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

BRUNET, S.; MARO, B. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. **Reproduction**, v.130, p.801-811, 2005.

BYRNE A.T.; SOUTHGATE J.; BRISON D.R.; LEESE H.J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.117, p.97–105, 1999.

CAN, A.; SEMIZ, O.; ÇINAR, O. Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in mouse oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v.9, p.749-756, 2003.

CELEGHINI, E.C.; DE ARRUDA, R.P.; DE ANDRADE, A.F.; NASCIMENTO, J., RAPHAEL, C.F., 2007: Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrossosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction Domestic Animal**. 42, 479-488.

COHEN, R.S. Oocyte patterning: dynein and kinesin, **Current Biology**, v.12, p.797–799, 2002.

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

CONNORS, S.A.; KANATSU-SHINOHARA, M.; SCHULTZ, R.M.; KOPF, G.S. Involvement of the cytoskeleton in the movement of cortical granules during oocyte

maturation, and cortical granule anchoring in mouse eggs. **Developmental Biology**, v. 200, p.103–115, 1998.

COY, P.; ROMAR, R.; PAYTON, R.R.; McCANN, L.; SAXTON, A.M.; EDWARDS, J.L. Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the S-enantiomer of roscovitine: effects on maturation, fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. **Reproduction**, v. 129, p.19-26, 2005.

CUMMINS, J.M. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproduction in Domestic Animals**, v.115, p.S23-29, 2004.

DE LA FUENTE, R.; EPPIG, J.J. Transcriptional Activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. **Developmental Biology**, v.229, p.224–236, 2001.

DE SOUSA, P.A.; CAVENEY, A., WESTHUSIN, M.E.; WATSON, A.J. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. **Theriogenology**, v. 49, p.115-128, 1998.

DE SOUSA, P.A.; MARTINS, DA SILVA S.J.; ANDERSON, R.A. Neurotrophin signaling in oocyte survival and developmental competence: A paradigm for cellular totipotency. **Cloning And Stem Cells**, v.6, p.375-385, 2004.

DEKEL, N. Cellular Biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.234, p.19–25, 2005.

DODE MAN; ADONA, P.R. Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. **Animal Reproduction Science**, v.65, p.171-180, 2005.

DUMONT, J. UMBHAUER, M.; RASSINIER, P.; HANAUER, A.; VERLHAC, M.H. p90Rsk is not involved in cytostatic factor arrest in mouse oocytes. **The Journal of Cell Biology**, v.169 (2), p.227-231, 2005.

EDWARDS, R.G. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. **Nature**, London, v.208, p.349-51, 1965.

EPPIG, J.; O'BRIEN, M.; WIGGLEWORTH, K. Mammalian oocyte growth and development *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v.44, p.260-273, 1996.

EYERS, P.A.; LIU J.; HAYASHI, N.R.; LEWELLYN, A.L., GAUTIER J.; MALLER J.L. Regulation of the G₂/M transition in *Xenopus* oocytes by the cAMP-

dependent protein kinase. **The Journal Of Biological Chemistry**, v.280, p.24339-24346, 2005.

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

Fair T, Hyttel P, Motlik J, Boland MP, Lonergan P. Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes in vitro using butyrolactone I: Effects on oocyte ultrastructure and nucleolus function. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, p.375–386, 2002.

GANDOLFI, B.T.A.L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: 59 cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v.55, p.1255-1276, 2001.

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

GOOD, N.E.; WINGET, G.D.; WINTER, W.; CONNOLLY, T.N.; IZAWA S.; SINGH, R.M. Hydrogen ion buffers for biological research. **Biochemistry**, v.5, p. 467–477, 1966.

GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. **Cambridge University Press**, v.30, p.142, 1994.

GUTIERREZ-ADAN, A.; RIZOS, D.; FAIR, T.; MOREIRA, P.N.; PINTADO B.; De La FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Effect of Speed of Development on Mrna Expression Pattern in Early Bovine Embryos Cultured In Vivo or In Vitro. **Molecular Reproduction And Development**, v. 68, p.441–448, 2004.

HAMAGUCHI, M.S.; WATANABE, K; HAMAGUCHI, Y. Regulation of intracellular pH in sea urchin eggs by medium containing both weak acid and base. **Cell Structure and Function**, v. 22, p. 387-398, 1997.

HANDYSIDE, A.H.; HUNTER, S. Division and death of mouse blastocyst before implantation. **Roux's Archives of development Biology**, v. 195, p.519-526, 1986.

HASHIMOTO, S.; MINAMI N.; TAKAKURA, R., IMAI, H. Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest in vitro. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1696–1701, 2002.

HORNE, M.M.; GUADAGNO, T.M. A requirement for MAP kinase in the assembly and maintenance of the mitotic spindle. **The Journal Of Cell Biology**, v.161, p.1021–1028, 2003.

HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocyte classified by cumulus complex. **Zygote**, v. 5, p.371–376, 1997.

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

INOUE, M.; NAITO, K.; NAKAYAMA, T.; SATO, E. Mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle breakdown in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 58:130-136, 1998.

IWASAKI, T.; KIMURA, E.; TOTSUKAWA, K. Studies on a chemically defined medium for in vitro culture of in vitro matured and fertilized porcine oocytes. **Theriogenology**, v.51, p.709 – 720, 1999.

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.

KANO, F.; TAKENAKA, K.; YAMAMOTO A.; NAGAYAMA, K.; NISHIDA E; MURATA, M. MEK and Cdc2 kinase are sequentially required for golgi disassembly in MDCK cells by the mitotic *xenopus* extracts. **The Journal of Cell Biology**, v.149, p.357–368, 2000.

KERR J.F.; WYLLIE A.H.; CURRIE A.R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Câncer**, v.26, p.239, 1972.

KHATIR, H.; LONERGAN, P.; MERMILLOD, P. Kinetics of nuclear maturation and profiles of oocytes from prepubertal and adult cattle during *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v.50, p.917-929, 1998.

KIKUCHI, K.; NAITO, K.; NOGUCHI, J.; SHIMADA, A.; KANEKO, K.; YAMASHITA, M.; TOJO H.; Toyoda, Y. Inactivation of p34^{cdc2} kinase by the accumulation of its phosphorylated forms in porcine oocytes matured and aged in vitro. **Zygote**, v.7, p.173–179, 1999.

KIKUCHI, K.; NAITO K.; NOGUCHI, J.; SHIMADA, A.; KANEKO, K.; YAMASHITA M.; TOJO, H.; TOYODA, Y. Maturation/M-phase promoting factor: A regulator of aging in porcine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.63, p.715-722, 2000.

KIM, N.H.; CHO, S.K.; CHOI, S.H.; KIM, E.Y.; PARK, S.; PILL LIM, J.H. The distribution and requirements of microtubules an microfilaments in bovine oocytes *in vitro* maturation. **Zygote**, v.8, p.25-32, 2000.

KOTSUJI, F.; KUBO, M.; TOMINAGA, T. Effect of interactions between granulosa and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 100 (1), p. 151-156, 1994.

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. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. *Biology of Reproduction*, v.62(2), p.292-302, 2000.

LAGUTINA, I.; PONDERATO, N.; LAZZARI, G.; GALLI, C. Kinetics of oocyte maturation and subsequent development of IVF, parthenogenetic, and NT bovine embryos after meiotic inhibition with roscovitinre. *Cloning and Stem Cells*, v.4, p.113-119, 2002.

LEDAN, E.; POLANSKI, Z.; TERRET, M.E.; MARO, B. Meiotic Maturation of the Mouse Oocyte Requires an Equilibrium between Cyclin B Synthesis and Degradation. *Developmental Biology*, v.232, p.400–413, 2001.

LEFEBVRE, C.; TERRET, M.E.; DJIANE, A.; RASSINIER, P.; MARO, B.; VERLHAC M.H. Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. *The Journal of Cell Biology*, v.157, p.603–613, 2002.

LE GAL, F.; GALL, L., DE SMEDT, V. Changes in protein synthesis patterns during in vitro maturation of goat oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, v.32, p.1-8, 1992.

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.

LIU, Y.; SATO, T., SEHARASEYON, J.; SZEWCZYK, A.; A'ROURKE, B.; MARBAN, E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channel. Viable candidate effectors of ischemic preconditioning. *Annals of New York Academy of sciences*, v.874, p. 27-37, 1999.

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

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.

MAPELLI, M.; MASSIMILIANO, L.; ROVACE, C.; SEELIGER, M.A.; TSAI, L.H.; MEIJER, L.; MUSACCHIO, A. Mechanism of CDK5/p25 Binding by CDK Inhibitors. **Journal Of Medicinal Chemistry**, V.48, P.671-679, 2005.

MAYES, M.; SIRARD, M.A. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**,v.55,p.911-922, 2001.

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.183-188, 2001.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL R.; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **63 Molecular Reproduction and Development**, v.55. p.89-95, 2000.

MESQUITA, LG. **Bloqueio da fosforilação oxidativa no cultivo de embriões bovinos**. 2005. 74p. Tese (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2005.

MINGOTI, G.Z.; GARCIA J.M.; ROSA e SILVA, A.A.M. The effect of serum on in vitro maturation, in vitro fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes co-cultured with granulosa cells. **Brazilian journal of medical and biological research**, v.2, p. 213-217, 1995.

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

MORGIA, F.M.; TORTI, M.; MONTIGIANI M.; PISCITELLI, C.; GIALONARDO, M.; SCHIMBERNI, M.; GIANNINI, P.; SBRACIA, M. Use of a medium buffered with N-hydroxyethylpiperazine-N-ethanesulfonate (HEPES) in intracytoplasmic sperm injection procedures is detrimental to the outcome of in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 85, p. 1415-1419, 2006

MOTLIK, J.; PAVLOK, A.; KUBELKA, M.; KALOUS, J.; KALAB, P. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocyte. **Theriogenology**, v.15; 49(2), p.461-469, 1998.

NEBREDA, A.R.; FERBY, I. Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. **Current Opinion in Cell Biology**, v.12, p.666–675, 2000.

NEUBER E.; LUETJENS C.M, CHAN A.W.; SCHATTEN G.P. Analysis of DNA fragmentation of in vitro cultured bovine blastocysts using TUNEL. **Theriogenology**, v.57, p.2193–202, 2002.

OBERHAMMER, F.; FRITSCH, G.; SCHMIED, M.; PAVELKA M.; PRINTZ, D.; PURCHIO, T; LASSMANN, H.; SCHULTE-HERMANN, R. Condensation of the chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease. **Journal of cell science**, v.104, p.317-326, 1993.

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

PARK, Y.S.; KIM, S.S.; KIM, J.M.; PARK, H.D.; BYUN, M.D. The effects of duration of in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. **Theriogenology**, v. 64, p. 123-134, 2005.

PEIXER, M.A.S.; DODE, M.A.M.; RUMPF, R. In vitro production of embryos- Embrapa genetic resources and biotechnology point of view. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v.28, p. 163-166, supl., 2000.

PINCUS, G.; ENZMANN, E. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. **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 development capacity. **Molecular Reproduction and Development**, v.60, p.579-585, 2001.

REERS, M.; SMITH, T.W.; MOTTOLA-HARSHORN, C.; CHEN, A.; LIN M.; CHEN, L.B.; Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. **Methods in Enzymology**, v.260, p. 406-417, 1995.

REYNIER, P.; MAY-PANLOUP, P.; CHRÉTIEN, M.F.; MORGAN, C.J.; JEAN, M.; SAVAGNER, F.; BARRIÈRE, P.; MALTHIÈRY, Y. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v.7,p.425-429, 2001.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development** ;v.61, p.234–48, 2003.

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

ROUX, P.P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. **Microbiology and Molecular Biology**, v.68,p.320–344, 2004.

RUSSELL, D.F.; BAQIR S.; BORDIGNON J.; BETTS, D.H. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular reproduction and development**, v. 73(10), p. 1255-1279, 2006.

SAX, J.K.; DASH, B.C.; HONG, R.; DICKER, D.T.; EL-DEIRY, W.S. The Cyclin-Dependent kinase inhibitor butyrolactone is a potent inhibitor of p21WAF1/CIP1 expression. **Cell Cycle**, v.1, p.90-96, 2002.

SCHANG, L.M. Effects of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors on viral transcription and replication. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v.1697, p.197-209, 2004.

SCHROETER, D.; MEINECKE, B. Comparative analysis of the polypeptide pattern of cumulus cells during maturation of porcine cumulus oocyte complexes in vivo and in vitro. **Reproduction and Nutrition Development**, v.35, p. 85-94, 1995.

SCHIMMEL T.G., COFFMAN A.D., PARSONS S.J. Effect of Butyrolactone I on the Producing Fungus, *Aspergillus terreus*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.64, p.3707-3712, 1998.

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

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

SIRARD, M.A.; FLORMAN, H.M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; BARNES, F.L.; SIMS, M.L.; FIRST, N.L. Timing of Nuclear Progression and Protein Synthesis Necessary for Meiotic Maturation of Bovine Oocytes. **Biology of Reproduction**, v.40, p. 1247-1263, 1989.

STEUERWALD, N.; BARRITT, J.A.; ADLER, R.; MALTER, H.; SCHIMMEL, T.; COHEN, J.; BRENNER, C.A. Quantification of mtDNA in single oocytes, polar bodies and subcellular components by real-time rapid cycle fluorescence monitored PCR. **Zygote**. v.9, p.209–215, 2000.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; SOTOJKOVIC P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P.B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v.64, p.904-909, 2001.

SUN, X.F.; WANG, W.H.; KEEFE, D.L. Overheating is detrimental to meiotic spindles within *in vitro* matured human oocytes. **Zygote**. 12:65–70, 2004

SUN, Q.Y. Cellular and Molecular Mechanisms Leading to Cortical Reaction and Polyspermy Block in Mammalian Eggs. **Microscopy Research And Technique**, v.61, p. 342–348 , 2003.

SUN, Q.Y.; WU, G.M.; LAI, L.; PARK, K.W.; CABOT, R.; CHEON, G.H.T.; DAY B.N.; PRATHER, R.S.; SCHATTEN, H. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. **Reproduction**, v.122, p.155-163, 2001.

TARAZONA, A.M.; RODRÍGUEZ, OLIVERA-ANGEL, M. Mitochondrial Activity, Distribution and Segregation in Bovine Oocytes and in Embryos Produced *in Vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p.5-11, 2006.

TAKAHASHI, H.; KUWAYAMA, M.; HAMANO, S.; TAKAHASHI, M.; OKANO, A.; KADOKAWA, H.; KARIYA, T.; NAGAI, T. Effect of B-mercaptoethanol on the viability of IVM/IVF/IVC bovine embryos during long-distance transportation in plastic straws. **Theriogenology**, v.46(6), p. 1009-1015, 1996.

TONG, C.; FAN, H.Y.; CHEN, D.Y.; SONG, X.F.; SCHATTEN, H.; SUN, Q.Y. Effects of MEK inhibitor U0126 on meiotic progression in mouse oocytes: microtubule organization, asymmetric division and metaphase II arrest. **Cell Research**, v.13, p.375-383, 2003.

VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P.; MATHWIG, V.; ALEXANDER, S. Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos. **Hum Reprod**, v.17, p393–406. 2002.

VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P.; LEE, J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. **Hum Reprod**, v.10, p.415–424, 1995.

VAN SOOM, A.; YUAN, Y.Q.; PEELMAN, L.J.; DE MATOS, D.G.; DEWULF, J.; LAEVEENS, H.; DE KRUIF, A. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation on bovine embryos cultured under different oxygen tension with or without cysteine addition. **Theriogenology**, v.57, p. 1453-1465; 2002.

VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; DE KRUIF, A. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 47, p.47–56, 1997.

VELILLA, E.; IZQUIERDO, D.; RIDRIGUEZ-GONZALES, E.; LOPES-BEJAR, M.; VIDAL, F.; PARAMIO, M.T. Distribution of prepubertal and adult goat oocyte cortical granules during meiotic maturation and fertilization: ultrastructural and cytochemical study. **Molecular Reproduction and Development**, v.68, p.507-514, 2004.

VINGNERON, C.; PERREAU, C.; DALBIÉS-TRAN; 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

WANG, W.; DAY, B.N.; WU, G. How does polyspermy happen in mammalian oocytes? **Microscopy Research and Technique**, v.61, p.335-341, 2003.

WARD, F.; ENRIGHT, B.; RIZOS, D.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. **Theriogenology**, v.57,p.2105-2117, 2002.

WARZYCH, E.; WRENZYCKI, C.; PEIPPO J., LECHNIAK D. Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74 (3), p. 280-290, 2006.

WASSARMAN, P.M.; ALBERTINI, D.F. Cytochalasin b-induced pseudocleavage of mouse oocytes *in vitro*: asymmetric localization of mitochondria and microvilli associated with a stage-specific response. **Journal of Cell Science**, v. 21,p.523-535, 1994.

WESSEL, G.M.; BROOKS, J.M.; GREEN, E.; HALEY, S.; VORONINA, E.; Wong J, ZAYDFUDIM, V.; CONNER, S. The biology of Cortical Granules. **Cell Biology & biochemistry**, v.02912, p.90, 2001.

WILDING, M.; DALE, B.; MARINO, M.; DI MATTEO, L.; ALVIGGI, C.; PISATURO M.L.; LOMBARDI, L.; DE PLACIDO, G. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. **Human Reproduction**. v. 16, p. 909-917, 2001.

WU, G.M.; SUN, Q.Y.; MAO, J.; LAI, L.; PARK, K.W.; PRATHER, R.S.; DIDION, B.A.; DAY, B.N. High developmental competence of pig oocytes after meiotic inhibition with a specific M-phase promoting factor kinase inhibitor, butyrolactone I. **Biology of Reproduction**, v.67 p.170-177, 2002.

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

XU, K.P.; BRACKETT, B.G. A detailed analysis of early events during *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.82, p.127-134, 1988.

XU, X.; ZHANG, X.; LI, X.; CHENG, H.; KUAI, Y.; WANG, S.; GUO, Y. Translocation of classical PKC and cortical granule exocytosis of human oocyte in germinal vesicle and metaphase II stage. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.27, p.1353-1358, 2006.

YANG X, KUBOTA C, SUZUKI H, TANEJA M, BOLS PE, PRESICCE GA. Control of oocyte maturation in cow. **Theriogenology**, v. 49, p.471-482, 1998.

YOUNIS, A.I.; BRACKETT, B.G. Thyroid stimulating hormone enhancement of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Molecular Reproduction Development**, v.2, p. 44-51, 1992.

YUAN, Y.Q.; VAN SOOM A.; COOPMAN, F.O.; MINTIENS, K.; BOERJAN, M.L.; VAN ZEVEREN, A.; DE KRUIF, A.; PEELMAN, L.J. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v.59(7), p.1585-1596, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)