

BRENO BARROS DE SANTANA

**EFEITO DO BLOQUEIO MEIÓTICO SOBRE A MATURAÇÃO E
FERTILIZAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS**

GARANHUNS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – UFRPE
PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES – PGSRR

BRENO BARROS DE SANTANA

EFEITO DO BLOQUEIO MEIÓTICO SOBRE A MATURAÇÃO E
FERTILIZAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

Garanhuns

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns-PE, Brasil

S232e Santana, Breno Barros de
Efeito do bloqueio meiótico sobre a maturação
e fertilização de oócitos bovinos/Breno Barros de Santana
. – 2016.
59f. : il.

Orientadora: Gustavo Ferrer Carneiro
Coorientadores: André Mariano Batista, Victor Neto Maia
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Sanidade e
Reprodução de Ruminantes, Recife, BR-PE, 2016.
Inclui referências.

1. Reprodução de ruminantes 2. Fertilização in vitro
3. Biotecnologia 4. Maturação citoplásmica.
5. Embriões- Qualidade I. Carneiro, Gustavo Ferrer. orient.
II. Batista, Mariano Batista Maia. III. Maia, Victor Neto
, coorient. IV. Título

CDD 636.208926

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – UFPE
PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES – PGSRR**

**EFEITO DO BLOQUEIO MEIÓTICO SOBRE A MATURAÇÃO E
FERTILIZAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS**

**Dissertação elaborada por
BRENO BARROS DE SANTANA**

Aprovada em 29 / 07 / 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

Presidente da Banca / Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de
Garanhuns

Dr. André Mariano Batista

Universidade Federal Rural de Pernambuco – DMV

Prof. Dr. Victor Netto Maia

Universidade federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhus

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar pela grandiosidade do dom da vida, por todas as oportunidades que ela já me proporcionou, e por tantas que ainda virão;

Agradeço ao meu pai **Sandoval Cadengue de Santana** e a minha mãe **Lenice Barros de Santana** que sempre foi o alicerce da nossa família, exemplo de mulher e guerreira que sempre esteve ao meu lado nas horas mais tristes e mais felizes da minha vida, chorando e rindo junto a mim, lutando pela minha vida e pelos meus estudos;

A minha irmã **Elisabeth Barros de Santana** pelo apoio e compreensão. Por nossa grande amizade;

A todos os meus inúmeros tios, tias, primos e primas, que me apoiaram desde o início do curso, se orgulhando da minha garra e vontade de ser o melhor no que faço;

Ao meu orientador e amigo **Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro**, agradeço pelo apoio, paciência, por acreditar e confiar em mim, por todas as oportunidades que ela já me proporcionou, e ensinamentos que considero imprescindíveis e que irei levar pelo resto da minha vida pessoal e profissional;

Ao **Dr. André Mariano Batista**, pela orientação, amizade, incentivo e por valorosas contribuições para conclusão deste trabalho;

A **Profa. Dra. Gilcia Aparecida de Carvalho**, pela orientação, e amizade, apoio e carinho que jamais esquecerei;

Aos antigos e atuais companheiros de pesquisa e laboratório, **Polly, Carlos Rhuan Rocha Malta, Diogo Gutemberg Nascimento Bezerra, Elizabete Texeira Gomes, Gilvannya Gonçalves de Sobral, Isabella Lira Carreiro, Lucas Facundo de Moura Tobal, Maria Clécia Machado Costa, Matheus Dias de Moraes, Paulo Henrique Alexandre Borges, Willder Rafael Ximenes Cunha, Williane Rodrigues de Oliveira** os quais agradeço pela atenção, incentivo e contribuições;

Aos que fazem parte do Matadouro de Garanhuns e Bom Conselho, Dr. Marcos Maranhão, Dr. Daniel Peixoto, Dona, pela ajuda na liberação dos animais para as coletas de ovários e as boas tardes de conversas;

Ao **Prof. Dr. Marcelo Bertolini**, pelas orientações, pelo incentivo e pelas valorosas contribuições para conclusão deste trabalho;

Ao **Dr. José Augusto Bastos Afonso**, pelas orientações, pelo incentivo e pelas valorosas contribuições na estatística para conclusão deste trabalho;

A Equipe do laboratório de LBMD – UNIFOR, **Kaio Tavares, Carlos Mendez, Louhanna Pinheiro**, aos quais agradeço pela amizade, atenção, incentivo e valiosas contribuições na pesquisa;

A todos meus companheiros de profissão mais chegados, **Andreza Viana Débora Sobral, Karla Adrielen, Almir Alves**, por compartilharem momentos inesquecíveis, proporcionando lembranças que perdurarão por toda a minha vida;

Aos amigos de perto, **Renata, Nayara, Diego, Emerson, Rafaela, Jandeson, Carlinhos, Camila Porto e Oliveira, Ygor, Rafaela** e aos de longe, e aos de muito longe. O meu muito obrigado pela força e a cada um de vocês fica o meu carinho;

Aos membros da banca examinadora, pela disposição em estar aqui e pelas preciosas sugestões para engrandecer esse trabalho;

Agradecendo também a FACEPE pelo apoio com uma bolsa de estudos concedida durante a execução do trabalho.

Agradeço a todos que estiveram ao meu lado durante a pós-graduação e contribuíram de alguma maneira para conclusão da mesma, gostaria de expressar minha gratidão;

Muito obrigado!

RESUMO

As biotecnologias da reprodução são cada vez mais utilizadas com o objetivo de aumentar a oferta de material genético assim como preservação de germoplasma. A oferta de oócitos viáveis no estágio adequado para sua utilização é fundamental para o sucesso na produção *in vitro* de embriões. Uma alternativa seria evitar a retomada prematura da meiose após a remoção dos oócitos do ambiente folicular induzindo um bloqueio meiótico com o intuito de fornecer ao oócito mais tempo para que o mesmo possa sofrer modificações necessárias para suportar a fertilização e ter desenvolvimento embrionário normal. Inibidores, como o Rolipram, tem sido utilizado com esse intuito. Estes bloqueadores podem possivelmente melhorar a competência oocitária através de uma melhor maturação citoplasmática. O objetivo desse projeto foi avaliar o efeito do rolipram durante a maturação de oócitos bovinos na quantidade e qualidade de embriões produzidos *in vitro*. Para tanto, ovários foram coletados em abatedouro e transportados para o Laboratório de Reprodução Animal- LABRAPE da UFRPE/UAG. Os complexos cúmulos oócitos (CCOs) foram selecionados e divididos em 5 grupos: 1 Controle 0 hora: oócitos fixados e corados logo após a seleção para observarmos o status pós-coleta; Controle A: maturação por 24 horas na ausência de Rolipram; Rolipram 3 tratamentos: bloqueio da maturação por 24 horas em meio de maturação contendo (100, 150 e 200 μM). Após a maturação, uma parte dos oócitos dos grupos tratamentos e o grupo controle foram colocados em meio de maturação base por mais 24 horas para observar a reversão do bloqueio. Estes oócitos foram avaliados em microscópio equipado com epifluorescência. Após a maturação, o restante dos oócitos do grupo Controle e os tratamentos com Rolipram foram fecundados *in vitro* para avaliação das taxas de clivagem 48 horas pós fecundação e de blastocisto no D7 pós fecundação. Além disso, parte dos oócitos foram desnudados e armazenados para avaliação de expressão dos seguintes genes: Mater, BMP15 e BAX, para observação do efeito do bloqueador na expressão desses genes nos embriões. Não houve diferença estatística na expressão gênica entre grupo controle e tratamentos. Dos oócitos avaliados logo após a aspiração folicular, 79,00% encontravam-se em VG, QVGBD, ou MI, caracterizando-se como imaturos enquanto 13,40%, encontrava-se em MII e 7,60%, considerados degenerados ou não identificados. Nas diferentes concentrações de T100, T150 e T200 μM foram observadas diferenças em oócitos que atingiram a fase de MII comparando os tratamentos com o controle ($P = 0,003$). Quanto ao desenvolvimento embrionário houve diferenças na taxa de clivagem ($P < 0,05$) entre T150 e T200 quando comparados ao grupo C/24 e a taxa de blastocisto obteve diferença ($P < 0,001$) entre os tratamentos comparados ao grupo controle, sendo T100 μM a concentração que proporcionou menos efeitos negativos como diminuição da taxa de clivagem e blastocisto durante a pré-maturação de oócitos bovinos.

Palavras chave: Ruminantes, FIV, rolipram, maturação nuclear, maturação citoplasmática.

ABSTRACT

Biotechnology of reproduction has been increasingly used in order to improve genetic material as well as germplasm preservation. Provision of viable oocytes in stage suitable for its use is essential to the success of this technique. An alternative would be to prevent resumption of meiosis after removal of oocytes from follicular environment inducing a meiotic blockage with the aim of providing the oocyte more time available so that it could be possible to suffer modifications required to support fertilization and normal embryonic development. Inhibitors, as Rolipram has been used with this objective. These blockers can improve oocyte competence through a better cytoplasmatic maturation. The goal of this project was to evaluate the effect of rolipram during maturation of bovine oocytes on quantity and quality of embryos produced *in vitro*. Ovaries was collected at slaughter and transported to the laboratory of Animal Reproduction at UAG/UFRPE - LABRAPE. The COC`s were selected and divided into 5 groups: Control 1 (time 0): oocytes fixed and stained immediately after selection to observe after collection status; control: in vitro maturation for 24 hours in the absence of Rolipram; Rolipram in 3 different treatments: blockage for 24 hours in maturation medium containing (100, 150 and 200 μ M). After 24 hours, treatment and control groups were placed in maturation medium for over 24 hours to observe the reversal of the blockage. These oocytes were evaluated using an epifluorescent microscope to check maturation stage. After maturation, oocytes from control (within 24 hours of in vitro maturation) and treatments groups with Rolipram were in vitro fertilized 48 hours post fertilization to assess cleavage and blastocyst formation at D7 post fertilization. In addition, part of the oocytes were stored for expression of the following genes: Mater, BMP15 and BAX, to observe the effect of the blocker on expression of these genes in the embryos. As far as gene expression, no difference was seen between control group and treatments. The oocytes evaluated immediately after follicular aspiration 79.00% were in VG, QVGBD, or MI, characterized as immature and 13.40%, was in MII and 7.60%, were considered degenerate or not identified. In different concentrations of T100 and T200 T150 μ M, we observed significant differences in oocytes that have reached the MII phase comparing with control treatments ($P = 0.003$). As for the embryonic development, differences in the rate of cleavage ($P < 0.05$) were observed between T150 and T200 when compared to Control 24 hour Group. A difference was seen on blastocyst rate ($P < 0.001$) among the treatments compared to control group, being T100 μ M the concentration which provided less negative effects during pre-maturing of bovine oocytes.

Key words: bovine, IVF, oocyte nuclear maturation, rolipram, cytoplasmic maturation.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1. Diagrama Simplificado da ovogênese e Foliculogênese..... **15**

Artigo Científico

Figura 1. Efeito do Rolipram sobre os níveis dos genes A- MATER, B - BMP15 e C - BAX. Colunas sem sobrescritos não diferiram entre si ($p < 0,05$)..... **55**

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1.	Lista de Inibidores específicos da Fosfodiesterase.....	21
------------------	---	-----------

Artigo Científico

Tabela 1.	Iniciadores e sondas utilizados para a determinação da expressão gênica.....	50
Tabela 2.	Porcentagem (%), media (X) e desvio padrão (DP) do estágio nuclear de oócitos bovinos pré-maturados durante 24 horas com Rolipram.....	50
Tabela 3.	Valores médios (X) e desvios padrão (DP) do estágio nuclear de oócitos bovinos pré-maturados durante 24 horas com inibidor da maturação nuclear Rolipram, seguidos do cultivo de maturação por 24 horas.....	51
Tabela 4.	Porcentagem, Valores médios (X) e desvios padrão (DP) do desenvolvimento embrionário de ovócitos bovinos submetidos à uma pré maturação de 24 horas com rolipram e uma maturação por mais 24 sem inibidor.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AC- Adenil Ciclase
AGE – Ativação do Genoma embrionário
AMPc- adenosina 3'- 5' monofosfato cíclica
AI - anáfase
Bax - protein X
BMP15 - *bone morphogenetic protein 15*
CCOs – Compelxo cúmulo oócito
CGPs – Células germinativas primordiais
GVBD – Quebra da vesícula germinativa
IBMX – 1-isobutil, 3-metilxantina
LH – hormônio luteinizante
MATER 1 - *maternal antigen that embryos require*
MI - metáfase I
MII – metáfase II
MIV – Maturação in vitro
mRNA - segundo mensageiro
MPF- Fator de promoção de maturação
PDE – Fosfodiesterase
PIV- Produção in vitro
PKA - Proteína Kinase A
SPOM - simulated physiological oocyte maturation
TRA – Técnicas de Reprodução assistida
TI - telófase I
TGFβ – Fatores de Crescimento transformante beta
Thr14 – Treonina 14
Tyr 15 – Tirosina 15
VG – Vesícula Germinativa
6-DMAP – 6-dimetilaminopurina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Oogênese e folículogênese	16
3.2 Maturação nuclear e citoplasmática	17
3.3 Maturação Molecular	19
3.4 Bloqueio e retomada da meiose	19
3.5 Inibidores de meiose	21
3.6 Fertilização in Vitro	23
4. REFERÊNCIAS	24
5. ARTIGO CIENTÍFICO	34
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	59

1. INTRODUÇÃO

As técnicas de reprodução assistida (TRA) são cada vez mais utilizadas com o objetivo de solucionar problemas de infertilidade, assim como na Medicina Veterinária com o objetivo de aumento de material genético, ou como preservação de germoplasma. O sucesso dessas da produção *in vitro* de embriões depende da oferta de oócitos viáveis no estágio adequado para sua utilização (GUIMARÃES, 2013).

Apesar dos avanços, e de se encontrar na rotina comercial há vários anos, os índices de Produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos têm permanecido estáveis, com taxas de maturação nuclear e fecundação em torno de 80%, e de produção de blastocisto entre 35- 40%, sendo que em média apenas 30% destes embriões são capazes de gerar prenhez positiva pós-transferência (PONTES et al., 2011).

Quando os oócitos são maturados *in vivo*, essas taxas de blastocistos melhoram quando comparado as de oócitos maturados *in vitro*. Esses resultados demonstram que a maturação é ainda uma das etapas limitantes para o incremento na eficiência dessas técnicas (GUIMARÃES, 2013). Oócitos utilizados para a maturação *in vitro* (MIV) são privados das mudanças que ocorrem durante o período de dominância folicular, pois espontaneamente retomam a meiose quando removidos do ambiente folicular (THOMAS et al., 2004). Portanto, é provável que muitos dos oócitos recuperados para serem utilizados nas TRA tenham um reduzido potencial de desenvolvimento devido ao fato de não estarem totalmente competentes ou prontos para serem fecundados (PONDERATO et al., 2001). Uma alternativa seria evitar a retomada prematura da meiose após a remoção dos oócitos do ambiente folicular induzindo a um bloqueio meiótico (ADONA et al., 2008).

Vários métodos farmacológicos têm sido utilizados para inibir a retomada da meiose em diferentes espécies. Substâncias, tais como ativadores da Adenil Ciclase (AC) como o forskolin, inibidores do fator de promoção da maturação (MPF) como a 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), a roscovitina e a butirolactona-I e, inibidores da fosfodiesterase (PDE) como a cilostamida, milrinone, rolipram e o 1-isobutil, 3-metilxantina (IBMX) (KUBELKA et al., 2000; DODE; ADONA, 2001; PONDERATO et al., 2001; ADONA; LEAL, 2004; BARRETO, 2008).

Dentre os inibidores pode se ressaltar os específicos de PDE-4 dentre eles o Rolipram, onde esse tem efeito de prevenir a degradação do AMPc em oócitos bovinos, resultando em seu acúmulo nas células do cúmulo e no oócito, mantendo estáveis as

junções gap retardando assim a retomada da meiose (GILCHRIST e THOMPSON, 2007). (THOMAS et al., 2002).

É sabido que os oócitos de mamíferos precisam acumular fatores maternos necessários durante a foliculogênese para se estruturarem para os eventos que vão ocorrer após a fertilização (LEQUARRE et al., 2005; SONG; WESSEL, 2005). Dessa forma, a competência oocitária pode estar relacionada à uma quantidade de transcritos específicos presentes no “pool” de RNA mensageiro (mRNA) que é acumulada durante o crescimento do oócito e na fase final da foliculogênese (SIRARD et al., 2006; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012). Sendo assim, diferenças entre oócitos competentes e incompetentes podem estar relacionadas com a diferença nos padrões de expressão gênica (CAIXETA et al., 2009).

Apesar de muitos desses métodos inibirem a retomada da meiose adequadamente (DODE e ADONA, 2001; BARRETO, 2008), os resultados obtidos na produção de embriões ainda não são satisfatórios. Alternativas utilizando diferentes inibidores associados à suplementação do meio de retenção ainda necessitam de maiores estudos.

A utilização destes bloqueadores da meiose pode ser importante, como uma tentativa de melhorar a competência oocitária, através de uma melhor maturação citoplasmática, e na prevenção do envelhecimento do oócito durante o transporte, em um processo anterior ao cultivo de MIV.

E esse bloqueio da meiose poderia fornecer um tempo adicional ao oócito para que o mesmo possa sofrer modificações bioquímicas e estruturais necessárias para suportar a fertilização e ter desenvolvimento embrionário normal (DIELEMANN et al., 2002).

Sendo assim este estudo tem como objetivo avaliar o efeito do Rolipram na retenção da meiose durante a pré-maturação de oócitos bovinos e desenvolvimento embrionário *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito do Rolipram na retenção da meiose durante a pré-maturação de oócitos bovinos e desenvolvimento embrionário *in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações do Rolipram como inibidor da maturação nuclear de oócitos bovinos no meio de pré-maturação por 24 horas e a sua reversibilidade após uma maturação por mais 24 horas;
- Verificar a competência no desenvolvimento embrionário *in vitro* após a fecundação de oócitos previamente submetidos ao retardo da maturação nuclear;
- Avaliar a Expressão de genes relacionados com a competência oocitária (MATER, BMP15, BAX, β Actin), dos CCOs após aspiração, e efeito do Rolipram na expressão desses genes antes e após a reversão desse bloqueio.

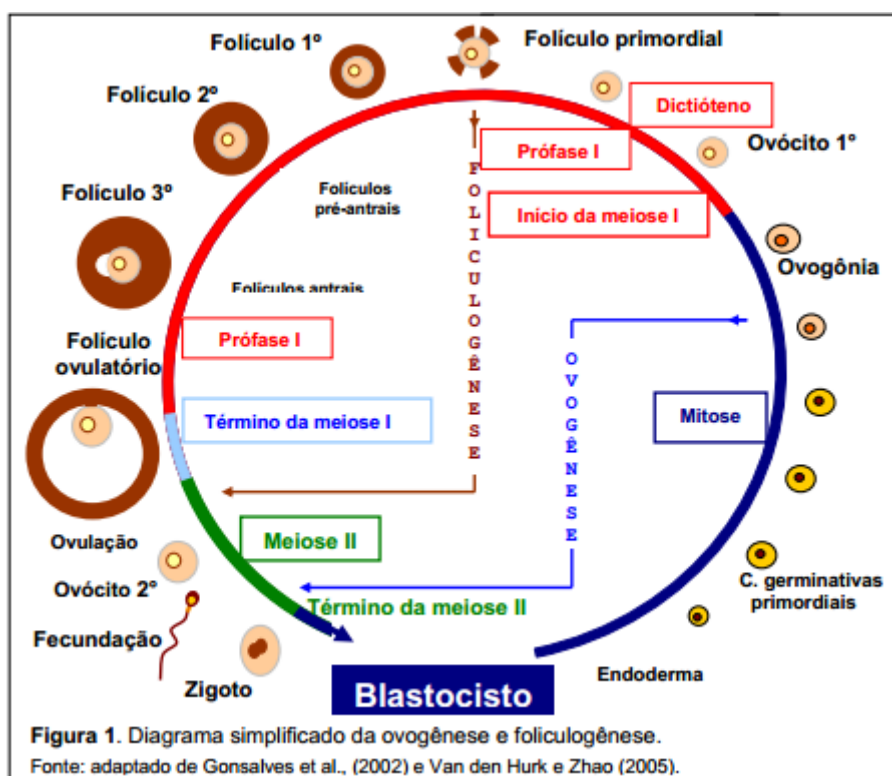
3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Oogênese e folículo-gênese

A oogênese pode ser definida como uma sequência de eventos pelos quais as células germinativas primordiais na fêmea passam, até atingirem o estágio de oócito maturo apto para a fecundação. Este processo de formação dos oócitos inclui sete etapas:

- 1- Formação das células germinativas primordiais (CGPs);
- 2 - Migração das CGPs para as futuras gônadas;
- 3 - Colonização das gônadas pelas CGPs;
- 4 - Proliferação das CGPs;
- 5 - Diferenciação das CGPs em oogônia;
- 6 - Início da meiose;
- 7 - Parada no estágio de diplóteno da prófase I da meiose (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

A folículo-gênese inicia-se com a formação dos folículos primordiais seguindo para primários, secundários, depois terciários e finalizando assim com a ovulação de um oócito maturo (GONÇALVES et al., 2002; VAN DEN HURK e ZHAO, 2005) (Figura 1).



Durante a oogênese os oócitos dos mamíferos permanecem retidos no estágio de diplóteno da prófase da primeira divisão meiótica, desde a vida fetal até pouco antes da ovulação. A retomada da meiose ocorre sob estímulo hormonal *in vivo* que tem início após o pico pré-ovulatório de LH durante o estro (FAIR, 2003; RODRIGUEZ e FARIN, 2004).

Os oócitos adquirem a maturação nuclear e citoplasmática durante a folliculogênese. Em humanos, a capacidade de terminar a meiose coincide com a formação do antro, quando o oócito alcança cerca de 80% do seu tamanho final (DURINZI et al., 1995). O desenvolvimento da competência, no que diz respeito à maturidade citoplasmática, é adquirido depois que o oócito já se tornou meioticamente competente. Assim, um oócito competente é aquele capaz de terminar a meiose, e assim ser fertilizado e gerar um embrião capaz de chegar a termo (SILVA, 2013).

Os bovinos quando nascem, dispõem de um número determinado de oócitos primários, cada um dos quais com o material genético duplicado (GONÇALVES et al., 2002). O processo de diferenciação dos oócitos primários (imatuross) para secundários (matuross) é iniciado na maturidade sexual quando, a intervalos médios de 21 dias, um oócito (2n) conclui a primeira meiose iniciada na fase fetal. (MOORE e PERSAUD, 2000; GONSALVES et al., 2002; HAFEZ, 2002).

3.2 Maturação nuclear e citoplasmática

O processo de maturação compreende uma série de eventos nucleares e citoplasmáticos que preparam o oócito para a fecundação. Dentre o processo nuclear envolve a quebra da vesícula germinativa – QVBD, condensação dos cromossomos, marcando o final da prófase I e progressão pelos estádios de metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase (TI), completando a primeira divisão meiótica, passando rapidamente para metáfase MII, da segunda divisão meiótica. (GOTTARDI e MINGOTI, 2009).

Os oócitos bovinos quando aspirados dos folículos e submetidos ao processo *in vitro* perdem o contato com as células da granulosa murais do folículo com as quais estabelecia uma rede de comunicação por meio de junções Gap (BYSKOV et al, 1997; DOWNS e HUNZICKER-DUNN, 1995). O rompimento desta barreira físico-química promove a condensação da cromatina e quebra da membrana nuclear (vesícula germinativa) fazendo com que a maturação nuclear que estava bloqueada em prófase I

da meiose, progrida até metáfase II (EDWARDS, 1965) que leva em média de 18 a 24 horas e a quebra da vesícula germinativa ocorre entre 8-12 horas, a MI de 12-15 horas, a AI e TI de 15-18 horas e MII de 18-22 horas após a retirada do oócito do ambiente folicular (SIRARD et al., 1989; WU et al., 1996, DODE; ADONA, 2001).

Já na maturação citoplasmática ocorrem vários eventos dentre eles a reorganização de organelas, que migram pelos microtúbulos e microfilamentos, as mitocôndrias e o complexo de Golgi, que inicialmente se localizam em uma área periférica no oócito imaturo, e posicionam-se em uma área perinuclear. Os grânulos corticais, produtos do complexo de Golgi que se localizavam inicialmente na porção central do oócito, durante o processo de maturação, migram para a periferia do mesmo, ancorando na membrana plasmática. Esse processo é importante para a fecundação, pois, ao liberarem seu conteúdo causam modificações na membrana plasmática e na zona pelúcida a fim de evitar a polispermia (QUETGLAS, 2007).

Além disso, ocorrem alterações na síntese de proteínas específicas resultando em uma cascata de fosforilação e desfosforilação, envolvidas na regulação da retomada da meiose. Nesse período observa-se a degradação da adenosina monofosfato cíclico (AMPC), aumento dos níveis de cálcio e aumento na atividade de proteínas quinases. A proteína denominada de fator de promoção da maturação (MPF) é responsável pelo início da maturação, atuando de forma que assegure que o ciclo celular prossiga de forma correta (KUBELKA et al., 2000).

Na fertilização *in vitro*, a ausência de uma seleção rigorosa faz com que sejam obtidos oócitos de folículos imaturos e com uma grande variedade de estágios de maturação que mesmo com a utilização de boas condições de cultivo observa-se um decréscimo na qualidade dos embriões produzidos (BLANCO et al., 2011; HENDRIKSEN et al, 2000; MACHATKOVA et al, 2004).

Apesar dos esforços para alcançar os melhores resultados, somente 30-40% dos oócitos maturados *in vitro* chegam ao estágio de blastocisto (SIRARD et al 2006), o que está relacionado com a redução na aquisição de competência após o cultivo *in vitro*. Este fator está associado a uma série de modificações estruturais e bioquímicas no núcleo (maturação nuclear) e citoplasma (maturação citoplasmática) para adquirirem tais capacidades, que em seu conjunto são denominadas de maturação oocitária (GONÇALVES et al., 2002).

Tanto a maturação nuclear como a maturação citoplasmática envolvem mudanças, onde estas devem ocorrer simultaneamente conferindo assim aos oócitos a

capacidade de serem fecundados, e terem desenvolvimento embrionário normal (DODE et al., 2000).

3.3 Maturação Molecular

Alguns genes estão associados com o desenvolvimento da competência oocitária pois estes estão envolvidos na regulação da transcrição, tradução e modificações pós-traducionais de proteínas, regulação do ciclo celular, foliculogênese, estresse oxidativo, composição de histonas, sinalização via junções *gap*, metabolismo e sistemas de transporte (WRENZYCKI et al, 2007).

Dentre os genes que codificam estes transcritos destacam-se o MATER 1 (*maternal antigen that embryos require*), GDF 9 (*growth and differentiation factor 9*), BMP15 (*bone morphogenetic protein 15*), Bax (*protein X*) e Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), (HANRAHAN et al. 2004; BEBBERE et al., 2008).

Expressos no oócito a partir do estágio de folículo primário, o MATER desempenha uma importante função durante a embriogênese inicial (BEBBERE et al., 2008). Tal constatação é reforçada pelos estudos realizados por Tong et al. (2000) e Wu et al. (2003) em camundongos segundo os quais, na ausência do MATER, embora ocorra adequado desenvolvimento folicular, ovulação e fertilização com formação de zigotos normais, os embriões obtidos não se desenvolvem além do estágio de 2 células e tendem à degeneração. Sendo assim, o bloqueio no desenvolvimento observado em embriões cultivados *in vitro*, o qual coincide com ativação do genoma embrionário AGE, está possivelmente relacionado com a menor quantidade de MATER relatada em oócitos de bovino maturados *in vitro* (PEREIRA et al., 2010).

O GDF9 e a BMP15 são fatores parácrinos que são secretados pelos oócitos os quais pertencem à família dos fatores de crescimento transformantes beta (TGF β) considerados importantes peptídeos reguladores intraovarianos (GILCHRIST et al., 2008), regulando também a proliferação, esteroidogênese, apoptose e expansão das células do cumulus, favorecendo assim a competência do oócito para a fecundação e desenvolvimento embrionário (GILCHRIST et al., 2004; JUENGEL et al., 2004; HUSSEIN et al., 2006; YEO et al., 2008; HUSSEIN et al., 2011), onde altos níveis da forma madura de GDF9 no fluido folicular de humanos foram significativamente correlacionados com oócitos maduros e qualidade embrionária, ou seja, correlacionando positivamente à competência oocitária (GODE et al, 2011).

Com relação ao perfil de expressão, ambos os genes que codificam o GDF9 e a BMP15, são expressos durante o bloqueio meiótico oocitário em VG, sendo detectados já no folículo primordial em ovinos (JUENGEL et al., 2002). Ainda nesta espécie, Bebbere et al. (2008) constataram redução gradual do mRNA GDF9 durante a maturação oocitária, embriogênese inicial e AGE, com persistência até o estágio de mórula.

Já o Bcl-2, tem função anti-apoptótica, e o Bax, com função pró-apoptótica, sendo que o equilíbrio entre estas moléculas determina se a célula permanecerá ou não viável (YANG & RAJAMAHENDRAN, 2002). A ação anti-apoptótica do Bcl-2 é demonstrada pela quantidade significativamente menor de folículos primordiais em camundongos com deleção deste gene (RATTS et al., 1995) e pela menor porcentagem de atresia folicular quando este gene está superexpresso (MORITA et al., 1999), no sistema de MIV, estes mesmos autores constataram incidência marcadamente menor de apoptose em oócitos com elevada expressão de Bcl-2. Além disso, a superexpressão deste gene conferiu ao oócito resistência e proteção contra quimioterápicos adicionados ao meio de cultivo (MORITA et al., 1999).

A ação pró-apoptótica do Bax é evidenciada pela correlação direta entre a expressão deste gene e a elevada perda de oócitos por apoptose. Evidências demonstram ainda que oócitos com menor expressão do gene Bax apresentam maior habilidade em se manter viável com menor probabilidade de degeneração (DE FELICI et al., 1999). Esta mesma relação foi observada em embriões por Liu et al. (2000) de modo que aqueles considerados não viáveis e fragmentados apresentaram significativa prevalência de Bax em contraste aos embriões viáveis nos quais apenas o Bcl2 foi constatado. Sendo assim, o adequado estoque materno de mRNA Bcl-2 assim como o restabelecimento da transcrição deste gene a partir da EGA confere ao embrião competência para suprimir a ação do Bax e prosseguir seu desenvolvimento de maneira adequada.

3.4 Bloqueio e retomada da meiose

O bloqueio da meiose em oócitos é dependente de eventos de fosforilação catalisados pela proteína quinase A (PKA). Esta quinase, dependente de AMPc, faz parte de uma via de transdução de sinal que inclui as enzimas adenilato ciclase e fosfodiesterase. Dekel e Beers (1978) identificaram o AMPc como bloqueador da

meiose em oócitos de ratas. A hipótese é que o AMPc gerado pelas células somáticas do folículo ovariano seja transmitido para o oócito via junções Gap.

O AMPc após ser produzido liga-se a subunidade reguladora da PKA, que pode ser de tipo I ou II (MOCHLY-ROSEN, 1995). A subunidade II, localizada nas células do cumulus, é encontrada próxima a substratos proteicos, os quais são rapidamente fosforilados em resposta ao aumento da concentração intracelular de AMPc (nas células do cumulus), induzindo a retomada da meiose. A ativação da subunidade tipo I, presente dentro do oócito, mantém a meiose inibida (DOWNS e HUNZICKER-DUNN, 1995). Portanto, a alta concentração de AMPc nas células do cumulus leva à GVBD, enquanto que a alta concentração de AMPc no oócito leva a ativação da PKA que fosforila proteínas específicas do oócito, mantendo-o imaturo (BILODEAU et al., 1993). Dekel (2005) relata ainda que a ação inibitória do AMPc não é gerada pelo oócito, mas transmitida pelas células foliculares via junções gap.

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

3.5 Inibidores de meiose

A inibição da retomada da meiose tem sido sugerida como um meio dos oócitos adquirirem um tempo adicional para sofrer as modificações necessárias para aquisição de competência (LONERGAN et al., 2000). Portanto, este tempo adicional possibilitaria uma melhor sincronização entre os processos de maturação nuclear e citoplasmática com objetivo de maximizar a produção de embriões (FRANZ et al, 2002; LE BEAUX et al., 2003; MACHALKOVA et al., 2004; SIRARD et al., 1993; 1992). Para este fim, e

para o estudo dos pontos de controle do processo maturacional, inibidores farmacológicos e fisiológicos da maturação nuclear têm sido amplamente testados (LE BEAUX et al., 2003).

Albuz et al. (2010), mostraram que é possível simular o que ocorre *in vivo*, utilizando substâncias químicas. Esse sistema chamado de SPOM (maturação oocitária fisiológica simulada) inclui um curto período de pré-MIV (1-2 h) utilizando como inibidores da meiose o Forskolin (ativador da AC) o IBMX (inibidor não específico da PDE) de forma a gerar um rápido aumento nos níveis de AMPc tanto nas células do cumulus como no oócito, como ocorre nos CCOs imediatamente após o pico préovulatório de gonadotrofina. Várias tentativas têm sido realizadas com o intuito de manter a meiose estacionada com estabilização farmacológica (realizada pelo cicloheximide, 6-dimetilaminopurina, butirolactona I, roscovitina) ou com inibidores fisiológicos como as (células da teca) (RICHARD et al., 1997; SAEKI et al., 1997; AVERY et al., 1998; KUBELKA et al., 2000; MERMILLOD et al., 2000).

Outros inibidores são as Fosfodiesterases – PDEs essas são enzimas que degradam nucleotídeos cíclicos intracelulares, o AMPc ou o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), inativando-os. Em mamíferos, estas enzimas compreendem atualmente uma família de onze fosfodiesterases (Tabela 1) (CONTI, 2000).

Tabela 1: Lista de Inibidores específicos da Fosfodiesterase (FRANCIS et al., 2001)

Família	Inibidores
PDE 1	Vinpocetine, Zaprinast e SCH5 1866
PDE2	EHNA
PDE3	Cilostamide, Milrinone, Amrinone, Enoximone e Lixazinone
PDE4	Rolipram, RO 20-111724, Denbufyline e Sadarverine
PDE5	Sildenafil (Viagra), Zaprinast, DMPPPO, E4021, SCH5 1866 e GF248
PDE6	Sildenafil (Viagra), Zaprinast, DMPPPO, E4021 e GF248
PDE7	Benzothieno-et benzothiadiazine dioxides
PDE8	Dipyridamole e (IBMX- Insensible)
PDE9	Zaprinast e (IBMX – insensible)
PDE10	Papaverine
PDE11	Zaprinast e Dipyridamole

Cinco das onze famílias das PDEs estão presentes nos ovários: PDE1, PDE3, PDE4, PDE8 e PDE9 (BEAVO, 1995; CONTI, 2000; CONTI et al., 1991; FISHER et al., 1998; GILULA et al., 1978). Entretanto, a expressão da PDE3 foi relatada unicamente no oócito (NOGUEIRA et al., 2003; JENSEN et al., 2002; RICHARD et al.,

2001; TSAFRIRI et al., 1996; REINHARDT et al., 1995) ao contrário da PDE4 que é expressa tanto nas células da granulosa como nas células da teca (TSAFRIRI et al., 1996).

Há mais de 20 variantes de PDE4 presentes em células do ovário. No folículo de camundongos, utilizando a hibridação *in situ* revelou-se a presença de PDE4B nas células da teca, enquanto PDE4D foi encontrada nas células da granulosa (TSAFRIRI et al., 1996). Camundongos knockout para PDE4D apresentaram uma taxa muito baixa de fertilidade, bem como diminuição da taxa de ovulação em comparação com camundongos selvagens (JIN et al., 1999) provavelmente devido à diminuição da expressão do gene durante a diferenciação em células da granulosa (JIN et al., 1999; RICHARD et al., 2003). Em todos os casos, a expressão *in vivo* de PDE4D é importante para a diferenciação normal de células da granulosa e uma taxa normal de ovulação e fertilização.

Várias tentativas em adiar a maturação nuclear de oócitos bovinos através da modulação específica das PDEs atrasam a ruptura das comunicações das junções do tipo gap entre as células do cumulus e o oócito e aumentando assim a produção e a qualidade de blastocistos (CONTI, 2002; CONTI et al., 2002; SASSEVILLE et al., 2009). Em ratos, camundongos e suínos os inibidores das PDEs, tanto específicos como os inespecíficos, possuem uma capacidade reversível de manter os oócitos *in vitro* bloqueados na meiose.

3.6 Fertilização *in Vitro*

Sistemas de cultivo *in vitro* (CIV) são frequentemente utilizados com o objetivo de avaliar a eficácia da maturação oocitária e os fatores endócrinos envolvidos neste processo como um todo (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). A qualidade oocitária é essencial para a reprogramação da expressão genética considerando ativação do genoma uma chave fundamental para o posterior desenvolvimento embrionário HENDRIKSEN (2000).

Mudanças nos sistemas de CIV podem ter um impacto, não apenas no potencial de desenvolvimento e qualidade dos embriões produzidos, mas também no perfil de expressão desses genes (FELMER et al., 2011).

4. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

BEAVO, J. A. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Functional implications of multiple isoforms. **Physiological Reviews**, v.75, p. 725, 1995.

BEBBERE, D.; BOGLIOLO, L.; ARIU, F.; FOIS, S.; LEONI, G.G.; TORE, S.; SUCCU, S.; BERLINGUER, F.; NAITANA, S.; LEDDA, S. Expression pattern of zygote arrest 1 (*ZAR1*), maternal antigen that embryo requires (*MATER*), growth differentiation factor 9 (*GDF9*) and bone morphogenetic protein 15 (*BMP15*) genes in ovine oocytes and *in vitro*-produced preimplantation embryos. **Reproduction Fertility and Development**, v.20, p.908-915, 2008.

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

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

BYSKOV, A. G.; ANDERSEN, C. Y.; NORDHOLM, L.; THOGERSEN, H.; XIA, G.;
WASSMANN, O. ANDERSEN, J.V.; GUDDAL, E.; ROED, T. Chemical structure of
sterols that activate oocyte meiosis. **Nature**, v. 374. p. 559–562, 1995

CAIXETA, E.S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M.M.; JUNIOR, J.B.; DODE, M.A.N.
Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*:
an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction**
Fertility and Development, v.21. p. 655–664, 2009.

CONTI, M.; JIN, S. L.; MONACO, L.; REPASKE, D. R.; SWINNEN, J. V. Hormonal
regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Endocrinology Rev** v. 12. p. 218-
234, 1991.

CONTI, M. Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells.
Molecular Endocrinology v. 14. p. 1317-1327, 2000.

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

CONTI, M. Specificity of the cyclic adenosine 3'5' monophosphate signal in granulosa
cell function. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1653-1661, 2002.

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

DE FELICI, M.; DI CARLO, A.; PESCE, M.; IONA, S.; FARRACE, M.G.;
PIACENTINI, M. Bcl-2 and Bax regulation of apoptosis in germ cells during prenatal
oogenesis in the mouse embryo. **Cell Death Differ**, v.6, p.908-915, 1999.

DEKEL, N.; BEERS, W. H.; Oocyte maturation *in vitro*: relief of cyclic AMP inhibition
by gonadotropins. **Production National Academic Science USA**, v.75. p. 4369–4373,
1978.

- DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology** v. 234. p.19-25, 2005.
- DIELEMAN, S.J.; HENDRIKSEN, P.J.M.; VIUFF, D.; THOMSEN, P.D. et al. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v. 57, p. 5-20, 2002.
- DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C. M.; UENO, V. G.; ALVES, R. G. O. Efeito do tamanho do folículo na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de fêmeas zebuínas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 35, n. 1, p. 207-217, 2000.
- DODE, M.A.N.; ADONA, P.R. Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6- dimethylalaminopurine. **Animal Reproduction Science**. v. 65, p. 171-180, 2001.
- DOWNS, S.M.; HUNZICKER-DUNN, M. Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte cumulus cell complex by site selective analogs of cyclic adenosine monophosphate. **Developmental Biology**, v. 172. p. 72-85, 1995.
- DURINZI, K. L.; SANIGA, E. M.; LANZERDORF, S. E. The relationship between: size and maturation in vitro in the unstimulated human oocyte. **Fertility Sterility**, v.63. p. 404-406, 1995.
- EDWARDS, R.G. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus, monkey and human ovarian oocytes. **Nature**, v. 208. p. 349-351, 1965.
- FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**. v. 78. p. 203-216, 2003.
- FELMER, R. N.; ARIAS, M. E.; MUÑOZ, G. A.; RIO, E. J. H. Effect of different sequential and two-step culture systems on the development, quality, and RNA expression profile of bovine blastocysts produced in vitro. **Molecular Reproduction**, v. 78. p. 403-414. 2011.
- FISHER, D. A.; SMITH, J. F.; PILLAR, J. S.; DENIS, S. H. S.; CHENG, J. B. Isolation and characterization of PDE9A, a novel human cGMP-specific phosphodiesterase [In Process Citation]. **Journal Biology Chem**, v. 273, p. 15559-15564, 1998.

FRANCIS, S. H.; TURKO, I. V.; CORBIN, J. D. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. **Program Nucleic Acid Res Molecul Biology**, v.65, p.1-52, 2001.

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

GAUTIER, J.; NORBURRY, C.; LOHKA, M.; NURSE, P.; MALLER, J. Purified maturation promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. **Cell**, v. 54, p. 433-439, 1998.

GILULA, N.B.; EPSTEIN, M. L.; BEERS, W.H. Cell-to-cell communication and ovulation, a study of the cumulus-oocyte complex. **Journal Cell Biology**, v.78. p.58–75, 1978

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

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte–somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 431-446, 2004.

GONÇALVES, P.B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L; MONTAGNER, M. M.; DA COSTA, L. F.S. **Produção in vitro de embriões**. In: GONSALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V. J. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 1 ed., Livraria Varela: São Paulo, p.195-226, 2002.

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

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

HAFEZ, E.S. E. **Reprodução Animal**, 7ª Edição, Editora Manole LTDA. 380p, 2002.

HANRAHAN, J.P.; GREGAN, S.M.; MULSANT, P.; MULLEN, M.; DAVIS, G.H.; POWELL, R.; GALLOWAY, S.M. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). **Biology of Reproduction**, v.70, p. 900-909, 2004.

HENDRIKSEN, P.J.M.; VOS, P.L.A.M.; STEENWEG, W. N.; BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S.J. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. **Theriogenology**, v. 53, p. 11 -20, 2000.

HUSSEIN, T. S.; THOMPSON, J. G.; AND GILCHRIST, R. B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Development Biology** 296, 514–521, 2006.

HUSSEIN, T. S.; SUTTON-MCDOWALL, M. L.; GILCHRIST, R. B.; AND THOMPSON, J.G. Temporal effects of exogenous oocyte-secreted factors on bovine oocyte developmental competence during IVM. **Reproduction Fertility Dev.** 23, 576–584, 2011.

JENSEN, J. T.; SCHWINOF, K. M.; ZELINSKI-WOOTEN, M. B.; CONTI, M. DEPAOLO, L. V.; STOUFFER, R. L. Phosphodiesterase 3 inhibitors selectively block the spontaneous resumption of meiosis by macaque oocytes in vitro. **Human Reproduction**, v. 7. p. 2079–2084, 2002.

JIN, S. L.; RICHARD, F. J.; KUO, W. P.; D'ERCOLE, A. J.; CONTI, M. Impaired growth and fertility of cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D-deficient mice. **Proceedings National Academy Science**. v.96, p.11998-12003, 1999.

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

JUENGEL, J.L.; BODENSTEINER, K.J.; HEATH, D.A.; HUDSONA, N.L.; MOELLER, C.L.; SMITH, P.; GALLOWAY, S.M.; DAVIS, G.H.; SAWYER, H.R.; MCNATTY, K.P.; Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83. p. 447–460, 2004.

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. p. 292-302, 2000.

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

LEQUARRE, A.S.; VIGNERON, C.; RIBAUCCOUR, F.; HOLM, P.; DONNAY, I.; DALBIÈS-TRAN, R.; CALLESEN, H.; MERMILLOD, P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology**, v.63, p.841- 859, 2005.

LIU, H.C.; HE, Z.Y.; MELE, C.A.; VEECK, L.L.; DAVIS, O.; ROSENWAKS, Z. Expression of apoptosis-related genes in human oocytes and embryos. *J. Assist. Reproduction Genetic*, v.17, n.9, p.521-33, 2000.

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

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

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

MORITA, Y.; PEREZ, G.; MARAVEI, D.V.; TILLY, K.I.; TILLY, J.L. Targeted expression of bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy-induced oocyte apoptosis *in vitro*. **Molecular Endocrinology**, v.13, p.841-850, 1999.

MOORE, K. T; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia básica**. 5 ed. Guanabara: Koogan, 2000. 453p.

MOCHLY-ROSEN, D. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. (Signal Transduction). **Science**, v. 268 p. 247-255,1995.

NOGUEIRA, D.; ALBANO, C.; ADRIAENSES, T.; CORTVRINDT, R.; BOURGAIN, C.; DEVROEY, P.; SMITZ, J. Human oocytes reversibly arrested in prophase I by phosphodiesterase type 3 inhibitor in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 69. p.1042-1052, 2003.

PEREIRA, M.M.; COSTA, F.Q.; OLIVEIRA, A.P.; SERAPIÃO, P.R.; MACHADO, M.A.; VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. Quantificação de transcritos maternos em oócitos bovinos submetidos a diferentes condições de maturação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, p. 1394-1400, 2010.

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

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.

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

RATTS, V.S.; FLAWS, J.A.; KOLP, R.; SORENSON, C.M.; TILLY, J.L. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the number of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. **Endocrinology**, v.136, p.3665–3668, 1995.

REINHARDT, R. R.; CHIN, E.; ZHOU, J.; TAIRA, M.; MURATA, T.; MANGANIELLO, V. C.; BONDY, C. A. Distinctive anatomical patterns of gene expression for cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Journal Clinical Investigation**, v.95, p.1528-1538, 1995.

RICHARD, F. J.; FOLTIER, M. A.; SIRARD, M. A. Role of the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase in the control of meiotic resumption in bovine oocytes cultured with theca cell monolayers. **Biology Reproduction Champaign**, v. 56, p. 1363- 1369, 1997.

RICHARD, F. J.; TSAFRIRI, A.; CONTI, M. Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation. **Biology Reproduction**. v. 65, p.1444–1451, 2001

RICHARD, F. J.; PARK, J. Y.; CHUN, S. Y.; PARK, J. H.; LAW, E.; HORNER, K.; JIN, S. L.; CONTI, M. Phosphodiesterase regulation is critical for the differentiation

and pattern of gene expression in granulosa cells of the ovarian follicle. **Molecular Endocrinology**, v.17, p.1117-1130, 2003.

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

SAEKI, K.; NAGAO, Y.; KISHI, M.; NAGAI, M. Developmental capacity of bovine oocytes following inhibition of meiotic resumption by cycloheximide or 6-dimethylaminopurine. **Theriogenology Stoneham**, v. 48, p. 1161-1172, 1997.

SASSEVILLE, M.; COTE, N.; GAGNON, M. C.; Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 415-425, 2009.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822 p.1896–1912. 2012.

SILVA, I.O. Avaliação da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos em sistemas de cultura definidos. 2013, 98 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília. Brasília, 2013.

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.

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

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

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

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

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

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

TONG, Z.B.; GOLD, L.; PFEIFER, K.E.; DORWARD, H.; LEE, E.; BONDY, C.A.; DEAN, J.; NELSON, L.M. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. **Nature Genetics**, v.26, p.267-8, 2000.

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

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63. p.1717-1751, 2005.

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

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology, Stoneham**, v. 68, p. 77-83, 2007.

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.

WU, X.; VIVEIROS, M.M.; EPPIG, J.J.; BA, Y.; FITZPATRICK, S.L.; MATZUK, M.M. Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. **Nature Genetics**, v.33, p.187-191, 2003.

YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Anim. Reproduction Science*, v.70, p.159-69, 2002.

YEO, C. X.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G.; AND LANE, M. Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. *Human Reproduction*, v. 23. p. 67–73, 2008

5. ARTIGO CIENTÍFICO

**Effect of Rolipram on in vitro maturation, gene expression and embryonic
development in bovines.**

(Artigo encaminhado ao periódico *Theriogenology*)

Effect of Rolipram on in vitro maturation, gene expression and embryonic development in bovines.

B.B.Santana^{1*}; G.G. Sobral¹; E.T. Gomes¹; A.M. Batista^{2, *}, L.P.R. Teixeira³, K.C.S. Tavares³, M. Bertolini³ G.F. Carneiro¹

^{1*} Garanhuns Academic Unity, Federal Rural University of Pernambuco, 55.292-270, Garanhuns, PE, Brazil; ²Andrology Laboratory, Veterinary Medicine Department, Federal Rural University of Pernambuco, 52.171-900, Recife PE, Brazil; ³ Molecular Biology and Development Laboratory, Experimental Biology Nucleus, University of Fortaleza, 60.811-905, Fortaleza CE, Brazil.

Abstract

The aim of this work was to evaluate the effect of meiotic blocker Rolipram during maturation of bovine oocytes, gene expression, and quantity and quality of embryos produced in vitro. Bovine ovaries were collected in slaughterhouse located at Garanhuns City, PE and transported to the laboratory of the UFRPE/UAG – LABRAPE. The CCOs were selected and divided into 5 groups: Control 0 time: oocytes fixed and stained immediately after selection to observe the pos collection status; Control: MIV for 24 hours; Rolipram treatments with MIV blocking for 24 hours in maturation medium containing (100, 150 and 200 μ M). After 24 hours all groups were reseeded in MIV for more 24 hours to observe the reversal of the blockage. Subsequently CCOS were subjected to same IVM system and fertilized, being checked for cleavage 48 hours post fertilization and D7 for blastocyst. In addition, part of the oocytes were stored for expression of the following genes: Mater, BMP15 and BAX, to observe the effect of the blocker on expression of these genes in the embryos. No difference was seen between control group and treatments on gene expression. Oocytes evaluated shortly after follicular aspiration, 79.00% were in GV, GVBD, MI, while 13.40%, was in MII and 7.60%, D/NI. Significant difference was observed in different concentrations (T100, T200 and μ M T150) in oocytes that have reached MII phase comparing with control treatments (P = 0.003). As for embryonic development it was observed differences in

cleavage rate ($P < 0.05$) between T150 and T200 when compared to C/24 Group. A high difference was observed on blastocyst rate ($P < 0.001$) among treatments compared to control group, being T100 μM the concentration which provided less negative effects during pre-maturation of bovine oocytes.

Keywords: Rolipram, IVF, IVM, oocyte, nuclear maturation, bovine.

1. Introduction

Assisted reproductive techniques (ART) are increasingly used in order to solve problems of infertility. The success of these techniques depends on the supply of viable oocytes in a stage suitable for its use [1].

Despite advances, regarding the improvement of medium and time of exposure to these medium, in vitro production of bovine embryos (IVP) have remained stable, with nuclear maturation and fertilization rates around 80 %, and blastocyst production between 35-40%, and on average, only 30% of these embryos are able to generate pregnancy after transfer [2].

When oocytes are matured in vivo, blastocyst rates improve compared to in vitro matured (IVM). These results demonstrate that IVM is still a limiting step to increase efficiency of these techniques [3]. Oocytes used for IVM are deprived of changes that occur during the period of follicular dominance, because they spontaneously resume meiosis when removed from follicular environment [4]. Therefore, it is likely that many of the oocytes recovered to be used in the ART have a reduced potential for development due to the fact that they are not competent or completely ready to be fertilized [5]. An alternative could be to prevent this premature resumption of meiosis after removing from follicular environment inducing a meiotic block [6].

The blockage of meiosis could possibly provide additional time to oocyte undergo biochemical and structural changes required to support fertilization and have proper embryonic development [7]. Several substances have been used to block meiosis, such as Adenil Cyclase (AC) activators such as forskolin, maturation-promoting factor (MPF) inhibitors such as 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), roscovitine and

butyrolactone-I and Phosphodiesterase (PDE) inhibitors such as cilostamida, milrinone, rolipram and the 1-3-isobutyl, metilxantina (IBMX) [8, 9, 5, 10].

Among the inhibitors we can highlight the specifics of PDE-4 including Rolipram, whose effect is to prevent the degradation of AMPc in bovine oocytes, resulting in its accumulation in cumulus cells and oocyte, keeping gap junctions stable, retarding resumption of meiosis [11, 4]. These modifications in the conditions of pre-maturing oocyte in a presence of an inhibitor of nuclear maturation has been used in order to achieve a better synchronization between nuclear and cytoplasmic maturation processes [12, 13, 14, 15, 16].

It is known that oocyte competence is closely related to a certain amount of specific transcripts present in mRNA, accumulated during the development of the oocyte and the final phase of the folliculogenesis [17, 18]. In this way, the differences between oocyte viability can also be related to a difference in gene expression patterns of certain transcripts [19]. One of the genes encoding these transcripts include the MATER 1 (maternal antigen that embryos require), BMP15 (bone morphogenetic protein 15), and Bax (protein X) [20, 21]. Therefore this work aimed to observe the effect of Rolipram on nuclear stage embryonic development and gene expression of transcribed Mater, BMP15, and BAX.

2. Materials and methods

In vitro embryo production

2.1. Oocyte collection and in vitro maturation

Bovine oocytes were collected from a local abattoir 5 minutes from the laboratory and immediately transported in saline 0.9% NaCl, supplemented with 50 mg/L de gentamicine at a temperature of 37° C, where 1993 cumulus oocytes complexes (COCs) from follicles between 2 and 8 mm in diameter were aspirated using 10 mL syringe attached to 25 x 8 needles.

All reagents used in this study were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) unless cited. The rolipram (R6520) was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) to a concentration of 20 mg/mL and stored at -20 C.

Experiment 1: influence of Rolipram on the resumption of meiosis

The COCs were selected from Grade I to Grade III [22]. After selection, oocytes were washed in TCM-199 HEPES, which consisted of TCM-199 containing Hank's salts and L-glutamine (Gibco, Life Technologies, NEW YORK, USA) supplemented with 25 mM HEPES, 0.2 mM pyruvate and 0.4% bovine fetal serum. To evaluate the effect of Rolipram on the resumption of meiosis, COCs (n=630) was divided into eight repetitions with average 16 COCs per group underwent to a IVM for 24 hours in the following treatments: T0-stripped, stained and evaluated after aspiration; T1 – IVM medium without inhibitor; T2-100 μ M rolipram; T3-150 μ M rolipram and T4-200 μ M rolipram. The COCs were transferred to drops of 100 μ L in a Petri dish (35x10 mm Corning, 430165), covered with mineral oil and kept in incubator with 38.5 C and 5% CO₂. The IVM medium consisted of TCM-199 containing Earle's salts and L-glutamine (Gibco, Life Technologies, NEW YORK, USA) supplemented with 0.2 mM pyruvate, 2.2 mg/mL sodium bicarbonate, 5.0 mg/mL LH (Bioniche, Belleville, ON, Canada), 0.5 mg/mL FSH (Bioniche, Belleville, ON, Canada), 0.4% bovine Fetal Serum and 50 μ g/mL gentamicin. After culture, to assess the progression of meiosis, oocytes were denuded and stained with Hoechst 33342 (10 μ g/mL) and analyzed under an epifluorescence microscope (Leica DM2500). Oocytes were classified according to stage of nuclear maturation as germination vesicle (GV), germinal vesicle break down (GVBD), Metaphase I (MI), and Metaphase II (MII).

Experiment 2 – evaluation of the reversibility of meiotic blockage with rolipram for 24 hours

In order to assess whether the blockage induced meiosis was reversible, COCs from control and treatment groups (n=431) divided into eight repetitions with an average of 13 COCs per group were submitted to IVM for 24 hours under the treatments described. After 24 hours of IVM, COCs were washed with maturation without inhibitor and transferred to drops of 100 μ L of maturation medium without inhibitor covered by mineral oil and cultured with 38.5° C and 5% CO₂ for over 24 hours. After this period, meiotic progression assessment was carried out.

Experiment 3: influence of Rolipram on the rates of cleavage and embryonic development

Groups containing 25 COCs, on average, divided into eight repetitions (n = 815) after going through the blocking process and resumption of meiosis were in vitro fertilized. For IVF, frozen semen from the same Bull and same batch were used. Frozen semen were thawed at 37° C for 30 seconds and prepared according to the technique of

Percoll gradient (Amersham Biosciences, 17-0891-01). Sperm were added to microdrops of fertilization at a final concentration of 2×10^6 sperm/mL. Fertilization was done in TALP-IVF. The sperm and oocytes were coincubated in drops of 100 μ L of medium under mineral oil in Petri dish (35 x 10 mm. Corning, 430165) for a period of 18 hours. After 18 hours of IVF, oocytes were partially stripped with a micro-pipetter of 50 μ L. After partial denudation, oocytes were transferred to SOF (synthetic oviduct fluid) in drops of 100 μ L and 48 hours of in vitro culture (D3), it was assessed the cleavage rate. Cleaved oocytes remained in the culture medium and the rest were removed and discarded. On the fifth day (D5) of in vitro culture a partial change of medium (feeding - 40%) was made and from the seventh (D7) and the eighth day (D8) was made the assessment of blastocyst formation rate (D7). Culture was conducted in incubator at a temperature of 38.5° C, containing 5% CO₂ in atmospheric air and 99% humidity. Every 48 hours, 50% of the medium was renewed. Cleavage rate was reviewed 48 hours post fertilization [23].

Experiment 4: Evaluation of gene expression in COCs 0h, cultured in pre-IVM 24h with Rolipram and pre-IVM 24h with Rolipram + extra 24h of IVM. Total RNA extraction and reverse transcription

Groups composed of 3 to 4 COCs, on average, divided into 4 repetitions (n = 117) were stripped mechanically after aspiration and in all treatments 24h after blockage and 48h after blockage release, were stored in -80C until extraction.

Extraction was performed using the buffer lysis of the SuperScript® caps III CellsDirect™ cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific), adding to each sample 10 μ L of Resuspension Buffer and 1 μ L of Lysis Enhancer. Then, the samples were incubated at 75 C for 10 min and treated with DNase I. Reverse transcription was performed using oligo (dT) 20 starters and the SuperScript III enzyme (Thermo Scientific), according to manufacturer's recommendations, to 50C for 1 hour. The cDNA of each experimental group remained stored in freezer to -20° C until further use.

Real time PCR

For the quantification of gene expression in the samples obtained, primers were designed for the genes MATER, BMP15, and BAX. The gene for β -Actin was used as housekeeping. For each primer used, standard curves was performed for determining efficiency of each gene amplification, which were established between 90 and 110%.

For all the qPCRs, were used the TaqMan® Gene Expression Master Mix (Thermo Scientific), 1.5 μ L of cDNA, 400 nM of each primer and 400 nM of TaqMan

specific probe (table 1) in a final volume of 20 μ L. The reactions were incubated at 50C for 2 minutes and 95C for 10 minutes, followed by 50 cycles of 95C for 15 seconds and 60C for 1 minute in a thermal cycler StepOne Plus (Applied Biosystems). Negative controls were prepared with the cDNA omitted during reaction. Reactions were made in duplicate for each sample (from all groups) of their respective repetition in optical 96 wells plates (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Relative quantification was performed using the $\Delta\Delta$ CT method (Livak and Schmittgen, 2001), normalizing the results by gene expression of β -Actin.

Statistical Analysis

All variables studied over the times and treatments have been subjected to ANOVA. The contrasts between the mean were made by Tukey test, with significant difference of $\alpha = 0.05$. Sigma Stat 3.1. (SYSTAT Software, Inc., SYSTAT SigmaPlot, SigmaStat are registered trademarks of Systat Software, Inc. 2004) were used.

Results

The oocytes evaluated shortly after follicular aspiration (zero time control-C/0), 32.00% (52/159) were in germinal Vesicle (GV), 2.60% (4/159) in the germinal vesicle breakdown (GVBD), 44.38% (70/159) in metaphase I (MI), 13.40% (21/159) in metaphase II (MII), and 7.60% (12/159) degenerates or not identified (D/NI).

For the percentage of oocytes that reached M-II, a significant difference were observed between control compared to all treatments ($P = 0,003$) (Table 2).

At Experiment 1, no difference ($P > 0.05$) were seen among treatments with oocytes treated at concentrations of 100 (T100), 150 (T150) and 200 μ M (T200) of Rolipram when compared with the stages of GV, GVGBD, MI. With respect to the percentage of oocytes that have reached the MII phase we observed a reduction as the inhibitor concentration was increasing, showing significant differences ($P = 0.003$) T100, T150 and T200, compared to control. With the other treatments, T100 showed no difference (table 2).

In the second part of the experiment, bovine oocytes treated after 24 hours of blocking have undergone an extra 24h of IVM without the blocker and then evaluated according to the stages of nuclear development. No differences ($P < 0.05$) were observed in any of the stages evaluated (table 3).

In a third experiment, groups of oocytes after exposed to the blocker and by IVM process were in vitro fertilized to evaluate cleavage rate in D3 and blastocyst rate

in D8, and statistical differences were observed ($P < 0.05$) on the rate of cleavage between the T150 and T200 when compared to the Group C/24 and a statistical difference were seen in Blastocyst rate evaluated in D7 ($P < 0.001$) all treatments compared to control group (table 4).

No difference ($P < 0.05$) was observed with regard to gene expression studies, when compared control groups 0h and 24h with treatments 24h and 48 hours for different transcripts. (Figure. 1).

DISCUSSION

The low blastocyst rates obtained in in vitro production technique can be justified by the use of immature oocytes, in general these have not yet acquired competence to the development, due to its premature withdrawal of follicular environment. However, it is necessary to develop alternatives to improvement of the IVM techniques, where this will offer appropriate conditions to majority of oocytes getting capable to produce viable embryos.

One of the first systems used to improve IVM efficiency was based on the proposed Protocol for [24], where it was performed some changes in attempt to simulate the events occurring in *in vivo* maturation. This system is based on two stages, the first consists of a short period of time using AMPc modulator agents, causing a rapid increase of the intra oocyte levels, similar to the action of LH *in vivo*. Oocytes then undergo a period of prolonged IVM, in the presence of an PDE inhibitor, to keep oocytes at GV stage so they have an additional time to suffer modifications that occur before the actual maturation [25] and to acquire the competence for development [8, 26].

For this reason this paper proposed the use of different concentrations of Rolipram, in order to induce meiotic block, reducing the risks of changes in the oocytes and possibly increasing embryonic development rates.

In the first experiment it was evaluated increasing concentrations of Rolipram (100, 150 and 200 μM) and its effect on induction of meiotic block. The index of oocyte in GV found in the control group 0 hour in this study was similar to other studies [27] where presented an average of 48. Different data were observed in a study done by other research group [9] that reported 100% of GV rates at the time 0 hour.

The divergence of data found in the literature can be justified by the relationship between the time of slaughter of the animals and selection of oocytes as well as the use of follicles of 2 to 8 mm. These factors may contribute to the decrease in the resumption of meiosis of oocytes until time of evaluation. On this point, Fry et al. (1997) [28] and Machatkova et al. (2000) [14] noted also that bovine oocytes recovered in ovaries of slaughterhouse are heterogeneous in terms of quality and competence, probably due to the diversity of age, breed, and reproductive status (follicle size, day of the estrus cycle, level of atresia and influence of dominant follicles) of cows that pass through the slaughterhouse in a given day which agree with our study because slaughtered animals of our region are mostly older animals or withdrawn dairy cows.

At the Group with oocytes blocked with Rolipram was possible to observe that even increasing Rolipram concentration, there was no differences in effectiveness of meiotic retention. Similar results has been found [29], that did not observed difference using a concentration of 100 μM in 9 hours of culture. Lopez et al. [30] obtained a different result than noted above, when using concentrations of 25, 50 and 75 μM noted that the lowest and highest concentration showed lowest rates of maturation being these 31.25 and 28.61%, whereas the concentration of 50 μM showed maturation of 76.83%. In our study data were different because the concentrations that obtained lower maturation rate were T150 and T200 where these presented 14.63 and 23.64% maturation rate. Thomas et al. [4] using a system of 16 hours of pre-maturation at Rolipram concentrations of 50, 250 and 500 μM observed a reduction in MII rates as increasing concentration. This factor was not observed in our study.

The response to the block can be caused by several factors such as: the expression of different subtypes of PDE4 (A, B, C and D) or variants generated by alternative splicing, causing a wide variety of Phosphodiesterase isoforms with different catalytic activity regulation mechanisms [31, 32].

Similar results were described [27] where oocytes blocked with Burolactona I 150 μM and 50 μM Roscovitina showed higher percentage of oocytes in MI compared to GV. Demonstrating a possibly differences in the maturations kinetics depending on the blocker and its mechanisms action.

Hormones such as LH and FSH when are added in the maturation medium promote an improvement in COCs expansion [33], stimulating production of signaling

substances by somatic cells, inducing resumption of meiosis. This is an important factor to be considered in the low result of oocytes in GV stage in time of pre-maturation where the medium used in the pre-maturation was similar to the IVM medium plus the blocker, so this medium has the addition of FSH which may have influenced the oocytes not to remain blocked in GV and continue maturing until the stage of MI.

Adona et al. [6] noted that most oocytes treated at concentrations of 100 (B100), 50 (B50) and 25 μM (B25) of Burolactona I remained blocked on meiosis in GV stage, on the proportions of 97.4, 84.4 and 65.1% respectively, with this you can see that the percentage of blockage decreases according to the concentration of the blocker. Similar effect was observed in our study showing 9.92, 17.07 and 20.00% at concentrations of T100, T200 and T150 respectively.

Regarding reversibility of meiotic blockage by Rolipram at the end of culture, no difference was seen between control group and treatments, however it was seen differences on GV percentage. Adona et al. [6] when using the Burolactona I inhibitor in concentrations of 10 and 100 μM noted that even with a high rate of oocytes in MII a small portion of oocytes still had remained in GV with 0.0 and 1.1 respectively, as the concentration of the blocker was increasing the data in this study were varying, but increased when the concentration was T100 the T150 with data from 6.68 the 8.50% though the concentration of T200 the amount of oocytes in GV declined to 3.60%.

When we compare the oocytes in MII, these showed a variation of 58.09 to 60.37% depending on Rolipram concentration. Similar data were reported [27] with the Roscovitine with 75.31% of the oocytes and different with Burolactona I with 83.89% [8].

Thus demonstrating that the pre-matured oocytes with Rolipram regardless of treatment, when compared to other nuclear maturation inhibitors the control group is able to reverse the meiotic block and resume meiosis reaching MII when removed from the medium containing inhibitors.

In embryonic development, the present study found differences from cleavage until blastocyst rate. Higher cleavage rate was observed in T150 and T200 being 39.00 and 36.05%. A study [27], using Burolactona I and Roscovitine found rates between 20

and 50% numerically similar to data found in this study [6], also using Butyrolactone did not see differences in the cleavage rate being these 80-86%.

Significant difference was observed in blastocyst rate evaluated in D7 between treatments and control group showing rates of C/24 33.99%, T100 13.25%, T150 11.76% and T200 11.53% indicating that when increase the concentration the results decreased. Unlike the results of [27] and [6] in which pre-matured oocytes with Butyrolactone I for 24 hours showed similar results when compared to control group in the production of blastocysts. The likely causes of low efficiency in embryo production could be related with concentrations of the inhibitor. Adona et al. [6] and [34] showed that the meiotic block with high concentration of BL I (150 μ M) had adverse effects on embryonic development of bovine oocytes.

Rizos et al. [35] observed that the proportion of embryos produced by IVF is affected by the intrinsic quality of the oocyte, but that the quality of the embryos is affected by in vitro culture. In this sense when nuclear maturation of oocytes occurs over a long period of time, adding the culture and blockage time (> 42 hours) can affect the quality of embryos produced.

Kim et al. [36] suggested that oocytes that aged in vitro have an embryonic development decreased, mainly by compromising cytoskeletal elements. Two facts should be taken into account in this result: a great time in culture, disrupts nuclear and cytoplasmic structures resulting in errors of chromosome pairing and fall in the proportion of fertilization [37, 38].

These data suggest that the timing of the in vitro fertilization of oocytes with nuclear maturation inhibitors may affect quality of embryonic development. Lagutina et al. [39] observed that 82.5% of the oocytes treated with Roscovitine reached maturation after 16 hours of IVM. The same observations were made [40], using Butyrolactone I (more than 85% of the oocytes in MII with 18 hours of IVM), as well as [10] who have obtained more than 90% of the oocytes blocked with Butyrolactone I or Roscovitine in M II after 18 hours of IVM. Probably this fact occurs due to the resumption of meiosis in these oocytes to be accelerated after the removal of the inhibitor, and indicates that these oocytes are already able to be fertilized with 16 or 18 hours of IVM.

In the present study we could also analyze the relative abundance of genes potentially involved in oocyte competence, because consequences in meiotic inhibition

on expression of some genes have not been much discussed [41]. With respect to gene expression. MATER transcripts in mice, appears to have important role in activation of embryonic genome [42, 43]. MATER transcripts are present in bovine oocytes from primary follicles [44] and its quantity is reduced with the resumption of meiosis, in both in vitro and in vivo maturation [45]. Which agree with the numerical drop in amount of transcripts observed in our study when we compare the 0h group with treatment groups.

However, variations in the amount of these transcripts may not be associated with oocyte competence to develop after in vitro fertilization [46]. In study conducted [42] and [43] with mice it was possible to observe, that although in the absence MATER occurs adequate follicular development, ovulation and fertilization with normal zygotes, embryos obtained do not develop beyond the 2-cell stage and tend to degenerate. Therefore, the block on the development observed in embryos cultured in vitro, which coincides with the EGA, are possibly related with the least amount of MATER reported in bovine oocytes matured in vitro [47]. This result is similar to our study, where concentrations of T150 T200 showed smallest quantities of transcripts and subsequently lower rates of cleavage and blastocyst formation. With respect to the profile of expression [21]. In his studies with sheep, showed a decreased level of MATER along with oocyte maturation. Similar results have been found in mice [43] and pigs [48].

In a study in sheep found that mRNA BMP15 remained constant until the embryo reach 8 cells stage after which there was a significant reduction, apparently being more important in later stages of development [21].

It was possible to notice that as you increased concentration of Rolipram occurred a increase in BMP15 gene expression demonstrating that this substance has influence on the expansion of cumulus cells, which reflects directly with oocyte maturation. The lowest value of BMP15 has been the concentration of T100, which also presented highest rates of cleavage and blastocyst formation between treatments.

It is known the correlation of Bax overexpression with the acceleration of apoptosis, where evidence shows that oocytes with low Bax gene expression have a higher ability to stay viable with smaller probability of degeneration [49].

Yang and Rajamahendran et al. [50] observed that the expression of BAX protein was higher in degenerated embryos and concluded that apoptosis is responsible for oocyte degeneration, fragmentation of the embryo and embryo loss.

In our study we found that values of BAX among 24h treatment has been increased according to the elevation of the blocker concentration, and correlate with the greater the concentration a higher meiotic block, suggesting that the oocytes are not yet competent or in acceleration of apoptosis and so less ability to remain viable. In other hand, after unblocking, there is a drop in the values of this gene expression showing no difference between treatments and values a bit higher than the C24, but still low cleavage rate and blastocyst formation suggesting that the block with Rolipram may predispose the acceleration of apoptosis, decreasing their ability to remain viable.

Data on the influence of IVM on BAX gene expression in bovine embryos are still scarce.

Warzych et al. [51] published data on the expression of this gene in embryos resulting from oocytes matured in different culture conditions. But did not observe changes in relative abundance of transcripts of BAX in bovine oocytes and hatched blastocysts after in vitro maturation in medium supplemented with PVP-40, BSA or BFS (bovine fetal serum).

CONCLUSION

It can be concluded that the use of Rolipram in a maturation system in concentrations of 100, 150 and 200 μM can provide a delay in nuclear maturation in MI without changing its reversibility irrespective of the concentration used and the concentration of 100 μM can be used in a way that will not interfere significantly in embryonic development.

Acknowledgments

The authors are grateful to FACEPE for the scholarship. To Garanhuns Bovine Clinic and Dr. José Augusto Bastos Afonso.

References

- [1] MOURA MDD, SOUZA MD, CARMO BD, SCHEFFER BB. Reprodução assistida. Um pouco de história. Revista SBPH 2009; 12: 2 - 10.
- [2] PONTES JHF, MELO-STERZA FA, BASSO AC, FERREIRA CR, SANCHES BV, RUBNIC KCP, SENEDA MM. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. Theriogenology 2011; 75: 1640-6.
- [3] PONTES J.H.F.; NONATO-JUNIOR I.; SANCHEZ B.V; ERENO-JUNIOR J.C.; UVO S.; BARREIROS T.R.R.; OLIVEIRA J.A.; HASLER J.F.; SENEDA M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. Theriogenology, v. 71, p.690-697, 2009.
- [4] THOMAS RE, THOMPSON J, ARMSTRONG CG, GILCHRIST RB. Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during in vitro maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. Biology of Reproduction 2002; 71: 1142-9.
- [5] 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 2001; 60: 579-85.
- [6] ADONA PR, PIRES PR, QUETGLAS MD, SCHWARZ KR, LEAL CL. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. Animal Reproduction Science 2008; 108: 49-65.
- [7] DIELEMAN SJ, HENDRIKSEN PJM, VIUFF D, THOMSEN PD. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. Theriogenology 2002; 57: 5-20.

- [8] KUBELKA M, MOTLIK J, SCHULTZ RM, PAVLOK A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. *Biology of Reproduction* 2000; 62: 292-302.
- [9] DODE MAN, ADONA PR. Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6- dimethylaminopurine. *Animal Reproduction Science* 2001; 65: 171-80.
- [10] ADONA PR, LEAL CLV. Meiotic inhibition with different cyclin dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. *Zygote* 2004; 12: 97-204.
- [11] GILCHIST, RB THOMPSON JG, Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology* 2007; 67: 6-15.
- [12] FRANZ LC, SQUIRES EL, RUMPF R, DODE MAN, SEIDEL JUNIOR GE. Effects of roscovitine in maintaining meiotic arrest in equine oocytes and subsequent maturation rates after inhibition. *Theriogenology* 2002; 58: 679-83.
- [13] LE BEAUX G, RICHARD FJ, SIRARD MA. Effect of cycloheximide, 6-DMAP, roscovitine and butyrolactone I on resumption of meiosis in porcine oocytes. *Theriogenology* 2003; 60: 1049-58.
- [14] MACHATKOVA M, KRAUSOVA K, JOSEKOVA E, TOMANEK M. Developmental of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology* 2004; 61: 329-35.
- [15] SIRARD MA, COENEN K. The co-culture of cumulus-enclosed bovine oocytes and hemisections of follicles: effects on meiotic resumption. *Theriogenology* 1993; 40: 933-42.
- [16] SIRARD MA, COENEN K, BILODEAU S. Effect of fresh or cultured follicular

fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology* 1992; 37: 39-55.

[17] SIRARD MA, RICHARD F, BLONDIN P, ROBERT C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 2006; 65: 126-36.

[18] SÁNCHEZ F, SMITZ J. Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2012; 12: 1896-912.

[19] CAIXETA ES, RIPAMONTE P, FRANCO M.M, JUNIOR J.B, DODE MAN. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reproduction Fertility and Development* 2009; 21: 655–64.

[20] HANRAHAN JP, GREGAN SM, MULSANT P, MULLEN M, DAVIS GH, POWELL R, GALLOWAY SM. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology Reproduction* 2004; 70: 900-9, 2004.

[21] BEBBERE D, BOGLIOLO L, ARIU F, FOIS S, LEONI GG, TORE S, SUCCU S, BERLINGUER F, NAITANA S, LEDDA S. Expression pattern of zygote arrest 1 (*ZAR1*), maternal antigen that embryo requires (*MATER*), growth differentiation factor 9 (*GDF9*) and bone morphogenetic protein 15 (*BMP15*) genes in ovine oocytes and *in vitro*-produced preimplantation embryos. *Reproduction Fertility and Development* 2008; 20: 908-15.

[22] BLONDIN P, SIRARD MA. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular reproduction and development* 1995; 41:54-62.

[23] STRINGFELLOW DA, SEIDEL, S.M. (Eds).Manual da sociedade internacional de transferência de embriões: um guia de procedimento e informações gerais para uso

em tecnologia de transferência de embriões enfatizando procedimentos sanitários. Illinois: Savoy, 1998. 180p.

[24] ALBUZ FK, SASSEVILLE M, LANE M, ARMSTRONG DT, THOMPSON JG, GILCHRIST RB. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Human Reproduction* 2010; 25: 2999-3011.

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

[26] 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. *Molecular Reproduction* 2000; 55: 89-95.

[27] MARQUES MG, MELLO MRBD, TAVARES LMT, NICACIO AC, ASSUMPTÃO MEOD, VISINTIN JA. Maturação e desenvolvimento embrionário in vitro de oócitos bovinos após bloqueio da meiose com inibidores de MPF. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2011; 48: 468-77.

[28] FRY RC, NIALL EM, SIMPSON TL, SQUIRES TJ, REYNOLDS J. The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology* 1997; 47: 977- 87.

[29] THOMAS RE, THOMPSON J, ARMSTRONG CG, GILCHRIST RB. Bovine cumulus-cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response of cell-specific cyclic adenosine 3', 5'- monophosphate cyclic levels. *Biology of Reproduction*; 70: 548-56, 2004.

[30] LÓPEZ YS, MEJÍA AM, ESCOBAR EE, JARAMILLO BA, ARAQUE NAVHE. Efecto del inhibidor de fosfodiesterasa tipo 4 —rolipram, sobre la maduración in vitro de oocitos bovinos. *Revista Colombiana de Ciências Pecuarias* 2008; 21: 59-65.

- [31] BEVERS MM, DIELEMAN SJ, VAN DEN HURK R, IZADYAR F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology* 1997; 47: 13–22.
- [32] AKTAS H, WHEELER MB, FIRST NL, LEIBFRIED-RUTLEDGE ML. Maintenance of meiotic arrest by increasing [cAMP]_i may have physiological relevance in bovine oocytes. *Journal of reproduction and fertility* 1995; 105: 237–45.
- [33] YOUNIS AI, BRACKETT BG. Thyroid stimulating hormone enhancement of bovine oocyte maturation in vitro. *Molecular Reproduction Development* 1992; 2: 44- 51.
- [34] LONERGAN P, GUTIÉRREZ-ADÁN A, PINTADO B, FAIR T, WARD F, FUENTE JD, BOLAND M. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-1 growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. *Molecular Reproduction Development* 2000; 57: 146-52.
- [35] RIZOS D, FAIR T, PAPADOPOULOS S, BOLAND M, LONDERGAN P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Molecular Reproduction Development* 2002; 62: 320-7.
- [36] KIM KS, MINAMI NM, UTSUMI K. Follicular cells affect the fertilizability and developmental competence of bovine oocyte in vitro. *Reproduction Fertility Development* 1997; 9: 763-6.
- [37] HUNTER RHF, GREVE T. Could artificial insemination of cattle be more fruitful? Penalties associated with aging eggs. *Reproduction in Domestic Animals* 1997; 32: 137-41.
- [38] LONG CR, HYTTEL P, FAIR T, CALLESEN H, GREVE T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 1995; 43: 51-80.
- [39] 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* 2002; 4: 113-9.

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

[41] LEAL CLV, MAMO S, FAIR T, LONERGAN P. Gene expression in bovine oocytes and cumulus cells after meiotic inhibition with the cyclin-dependent kinase inhibitor butyrolactone I. *Reproduction in Domestic Animals* 2012; 47: 615-24.

[42] TONG ZB, GOLD L, PFEIFER KE, DORWARD H, LEE E, BONDY CA, DEAN J, NELSON LM. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nature Genetics* 2000; 26: 267-8.

[43] WU B, IGNOTZ GG, CURRIE WB, 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* 1996; 45: 560-65.

[44] PENNETIER S, UZBEKOVA S, PERREAU C, PAPILLIER P, MERMILLOD P, DALBIÈS-TRAN R. Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos. *Biology of Reproduction* 2004; 71: 1359-66.

[45] THÉLIE A, PAPILLIER P, PENNETIER S, PERREAU C, TRAVERSO JM, UZBEKOVA S, MERMILLOD P, JOLY C, HUMBLLOT P, DALBIÈS-TRAN R. Differential regulation of abundance and deadenylation of maternal transcripts during bovine oocyte maturation in vitro and in vivo. *Biology of Reproduction* 2007; 77: 1-13.

[46] MOTA GB, BATISTA RITP, SERAPIAO RV, BOITÉ MC, VIANA JH, TORRES CA, DE ALMEIDA CAMARGO LS. Developmental competence and expression of the MATER and ZAR1 gene in immature bovine oocytes selected by Brilliant Cresyl Blue. *Zygote* 2009; 26: 1-8.

[47] PEREIRA MM, COSTA FQ, OLIVEIRA AP, SERAPIÃO RV, MACHADO MA, VIANA JHM, CAMARGO LSA. Quantificação de transcritos maternos em oócitos bovinos submetidos a diferentes condições de maturação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2010; 62: 1394-1400.

[48] UZBEKOVA S, ROY-SABA M, DALBIÈS-TRAN R, PERREAU C, PAPILLIER P, MOMPART F, THELIE A, PENNETIER S, COGNIE J, CADORET V, ROYERE D, MONGET P, MERMILLOD P. Zygote arrest 1 gene in pig, cattle and human: evidence of different transcript variants in male and female germ cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2006; 4: 4-12.

[49] FELICI MD, CARLO AD, PESCE M, IONA S, FARRACE MG, PIACENTINI M. Bcl-2 and Bax regulation of apoptosis in germ cells during prenatal oogenesis in the mouse embryo. *Cell Death Differ* 1999; 6: 908-15

[50] YANG MY, RAJAMAHENDRAN R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Animal Reproduction. Science* 2002; 70: 159-69.

[51] WARZYCH E, PEIPPO J, SZYDŁOWSKI M, LECHNIAK D. Supplements to in vitro maturation media affect the production of bovine blastocysts and their apoptotic index but not the proportions of matured and apoptotic oocytes. *Animal Reproduction. Science* 2007; 97: 334-43.

Table 1: Starters and probes used for determination of gene expression patterns

Gene	Primer Forward*	Primer Reverse*	Probe*
<i>Mater</i>	GGACCCCAAAGGATGAATTT	GAGCAGAGGTCTTCCCAGTG	GGGCTCCCCAAGGGCTGAAG
<i>GDF9</i>	TACAACACTGTTCGGCTCTTCAC	CAACAGTAACACGATCCAGGTAA A	CCCTGTGCTCAGCACAAGCAGGC
BMP1 5	TCGGGTACTACACTATGGTCTCAAT TC	GCCTCAATCAGAAGGATGCTAATG G	AGAATGTCCCTCAGCCTTCCTGTGTCC CT
BAX	GTTGTCGCCCTTTTCTACTTTGC	CAACTCGGGCACCTTGGT	ACAGGGCCTTGAGCACC
β Actin.	CGTGAGAAGATGACCCAGATCA	GGGACAGCACAGCCTGGAT	AGACCTTCAACACCCCTGCCATGTACG T

* Sequences are described at 5'-3'.

Table 2 – Percentage (%), mean (\bar{X} and Standard Deviation (SD) of nuclear stage from bovine oocytes pre-matured during 24 hours with Rolipram.

Groups	# oocytes / ($\bar{X} \pm SD$)	Nuclear Stage (# / % and $\bar{X} \pm SD$)				
		GV	GVBD	MI	MII	D/NI
C/24	117	13 (11,12)	0 (0,00)	39 (33,34)	61 (52,13)	4 (3,41)
	(14,62 \pm 3,20) ^a	(1,62 \pm 1,40) ^a	(0,00 \pm 0,00) ^a	(4,87 \pm 2,47) ^a	(7,62 \pm 4,30) ^a	(0,50 \pm 0,75) ^a
T100	121	12 (9,92)	9 (7,44)	60 (49,58)	33 (27,28)	7(5,78)
	(15,12 \pm 3,35) ^a	(1,50 \pm 0,75) ^a	(1,12 \pm 1,88) ^a	(7,50 \pm 3,25) ^a	(4,12 \pm 2,10) ^b	(0,87 \pm 0,99) ^a
T150	123	21 (17,07)	3 (2,43)	68 (55,29)	18 (14,63)	13 (10,58)
	(15,37 \pm 3,20) ^a	(2,62 \pm 1,99) ^a	(0,37 \pm 0,51) ^a	(8,50 \pm 3,20) ^a	(2,25 \pm 2,12) ^b	(1,62 \pm 1,76) ^a
T200	110	22 (20,00)	1 (0,90)	50 (45,46)	26 (23,64)	11 (10,00)
	(13,75 \pm 3,28) ^a	(2,75 \pm 1,75) ^a	(0,12 \pm 0,35) ^a	(6,25 \pm 2,37) ^a	(3,25 \pm 1,75) ^b	(1,37 \pm 1,76) ^a

GV: germinal vesicle; GVBD: germinal vesicle break down; MI: metaphase I; MII: metaphase II; D/NI: Degenerated and/or not identified. Different minor letters at same column indicates statistical difference by ANOVA (P<0,05) among treatments and distinct phases;

Table 3 – Mean (\bar{X}) and Standard Deviation (SD) of nuclear stage of bovine oocytes pre-matured during 24 hours with nuclear maturation inhibitor Rolipram, followed by 24 hours of in vitro culture.

Groups	# oocytes / ($\bar{X} \pm SD$)	Nuclear Stage (# / % and $\bar{X} \pm SD$)				
		GV	GVBD	MI	MII	D/NI
C/24	117	13 (11,12)	0 (0,00)	39 (33,34)	61(52,13)	4(3,41)
	(14,62 \pm 3,20) ^a	(1,62 \pm 1,40) ^a	(0,00 \pm 0,00) ^a	(4,87 \pm 2,47) ^a	(7,62 \pm 4,30) ^a	(0,50 \pm 0,75) ^a
T100	105	7 (6,68)	1 (0,95)	25 (23,80)	61 (58,09)	11 (10,48)
	(13,12 \pm 2,85) ^a	(0,87 \pm 0,83) ^a	(0,12 \pm 0,35) ^a	(3,12 \pm 2,47) ^a	(7,62 \pm 2,32) ^a	(1,37 \pm 1,50) ^a
T150	106	9 (8,50)	1 (0,94)	24 (22,64)	62 (58,49)	10 (9,43)
	(13,25 \pm 1,83) ^a	(1,12 \pm 1, 45) ^a	(0,12 \pm 0,35) ^a	(3,00 \pm 0,75) ^a	(7,75 \pm 2,76) ^a	(1,25 \pm 1,75) ^a
T200	111	4 (3,60)	0 (0,00)	30 (27,03)	67 (60,37)	10 (9,00)
	(13,87 \pm 2,47) ^a	(0,50 \pm 0,75) ^a	(0,00 \pm 0,00) ^a	(3,75 \pm 1,75) ^a	(8,37 \pm 2,06) ^a	(1,25 \pm 1,38) ^a

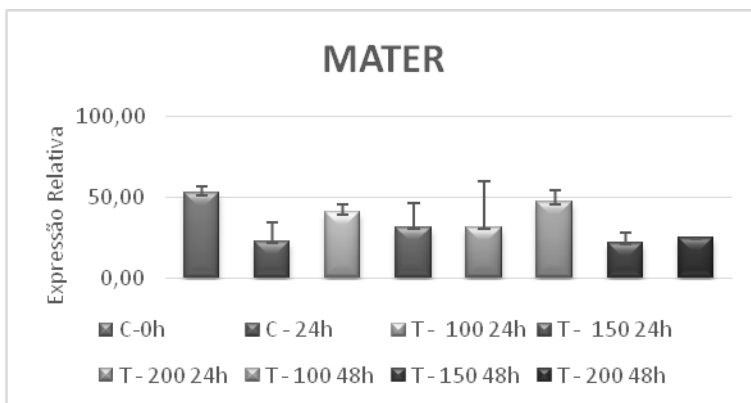
GV: germinal vesicle; GVBD: germinal vesicle break down; MI: metaphase I; MII: metaphase II; D/NI: Degenerated and/or not identified. Different minor letters at the same column indicates statistical difference by ANOVA (P<0,05) among treatments and distinct phases;

Tabela 4. Percentage, Mean (\bar{X}) and Standard Deviation (SD) from embryonic development of bovine oocytes submitted to a pre maturation of 24 hours with Rolipram plus 24 hours of in vitro culture without inhibitor.

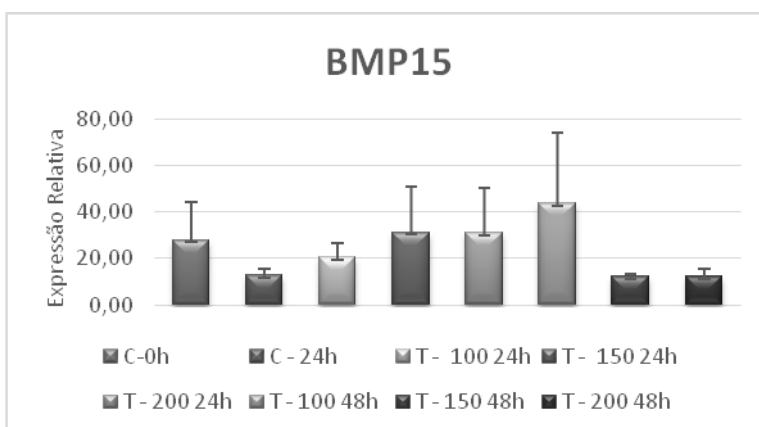
Groups	# oocytes / ($\bar{X} \pm SD$)	Embryonic Development (# / % - $\bar{X} \pm SD$)	
		Cleaved D3	Blastocyst D7
C/24	203	137 (67,48)	69 (33,99)
	(25,37 \pm 9,41) ^a	(17,12 \pm 8,00) ^a	(6,45 \pm 2,92) ^a
T100	200	90 (45,00)	27 (13,25)
	(25,00 \pm 8,99) ^a	(11,25 \pm 3,32) ^{ab}	(4,12 \pm 2,64) ^b
T150	204	81 (39,00)	24 (11,76)
	(25,50 \pm 7,50) ^a	(10,12 \pm 3,27) ^b	(4,25 \pm 2,37) ^b
T200	208	75 (36,05)	24 (11,53)
	(25,00 \pm 5,73) ^a	(9,37 \pm 3,06) ^b	(4,25 \pm 1,90) ^b

Different minor letters at the same line indicates statistical difference by ANOVA (P<0,05) between same treatment; Different capital letters at the same column indicates statistical difference by ANOVA (P<0,05) among treatments in distinct phases;

A



B



C

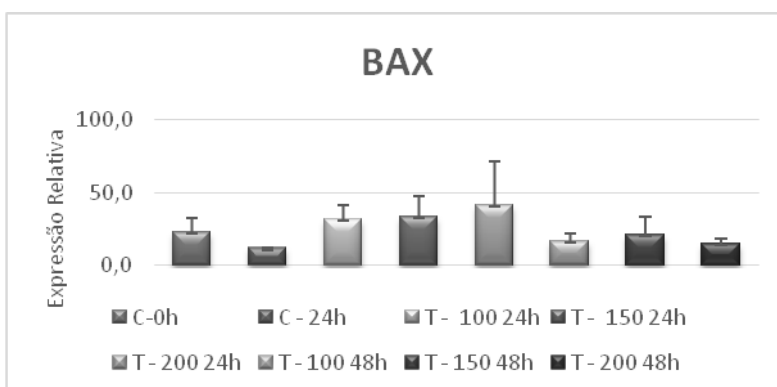


FIG. 1. Effect of Rolipram on gene levels A- MATER, B -BMP15 e C - BAX. Column without subscript show no difference ($p < 0,05$).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização do bloqueador de maturação nuclear Rolipram 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 foram detectadas algumas vantagens no uso do Rolipram, principalmente quando utilizado na concentração de 100 μ M comparado a concentração de 150 e 200 μ M onde está possibilitou melhora na maturação citoplasmática e no desenvolvimento de blastocistos, sendo a concentração que proporcionou menos efeitos negativos durante a pré-maturação de oócitos bovinos.

Deve-se considerar que foi possível manter a viabilidade oocitária por 24 horas a mais, comprovando este fato pela produção embrionária mesmo obtendo taxas abaixo do normal, levantando assim a hipótese de que este bloqueador pode ser utilizado para um transporte a longas distâncias e mesmo assim conseguir fertilização e produção embrionária.

Maiores estudos são necessários com relação a redução do tempo de maturação para compreendermos melhor os mecanismos envolvidos, pois após o desbloqueio há uma aceleração da maturação não havendo possivelmente necessidade de mais 24 horas de maturação, e durante esse tempo pode ter ocorrido envelhecimento dos oócitos e ter sido este um dos possíveis fatores que influenciaram nos resultados inferiores quando comparados ao controle.

Outro fator importante, é a utilização do FSH no meio de pré-maturação, pois este influencia na aceleração da maturação e pode ter afetado diretamente o bloqueio realizado pelo Rolipram podendo justificar os resultados encontrados nesse estudo.

No entanto há ainda muito que estudar sobre esse inibidor para definir qual é a melhor concentração, tempo máximo de pré-maturação, tempo de reversão do bloqueio meiótico e utilização de hormônios no meio de pré-maturação para que esses não estimulem alterações celulares que possam acarretar danos que prejudiquem o desenvolvimento embrionário.