

RITA DE CÁSSIA FERREIRA TAMEIRÃO PALHARES

**DINÂMICA DA MATURAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA DE OÓCITOS  
BOVINOS CULTIVADOS *IN VITRO* EM MEIO SUPLEMENTADO COM FULEROL**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como  
requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre  
em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Álan Maia Borges

Belo Horizonte

Escola de Veterinária – UFMG

2020

Palhares, Rita de Cássia Ferreira Tameirão, 1992.

P161d

Dinâmica da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos cultivados *in vitro* em meio suplementado com fulerol/ Rita de Cássia Ferreira Tameirão Palhares- 2020.

61f.: il.

Orientador: Alan Maia Borges

Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

Área de concentração: Reprodução Animal.

Bibliografia: f: 56 – 61.

1. Bovino - Teses - 2. Embrião - Teses – 3. Oócito - Teses – I. Borges, Alan Maia
- II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III. Título.

CDD – 636.089 4

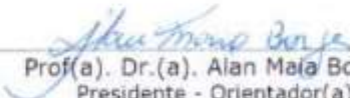
Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### RITA DE CÁSSIA FERREIRA TAMEIRÃO PALHARES

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Reprodução Animal.

Aprovado(a) em 29 de maio de 2020, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof(a). Dr.(a). Alan Maia Borges  
Presidente - Orientador(a)

  
Prof(a). Dr.(a). Leticia Zoccolaro Oliveira

  
Prof(a). Dr.(a). Mariana Machado Neves

*Dedico este trabalho à minha mãe, mulher guerreira e de fibra, por ter me dado o maior amor do mundo, pelo eterno apoio e incentivo.*

## AGRADECIMENTOS

Aqui se encerra mais uma etapa da minha vida, a conclusão do meu mestrado. Diante dessa conquista quero agradecer primeiramente à Deus, contigo compartilho a alegria desta maravilhosa conquista, pois foi através da Sua força e do Seu poder que eu consegui esta recompensa tão importante para mim. É um momento de muita emoção e meu coração está carregado de gratidão. Com Sua Soberana presença ao meu lado, eu consigo perceber que não existem impossíveis em minha vida.

Agradeço à Nossa Senhora Aparecida e Santa Rita de Cássia, pela intercessão, amparo, alegrias e bênçãos alcançadas. Que meus passos continuem guiados pelo Seu amor e que meus atos sejam testemunhos da minha devoção.

À minha família, pelo carinho, amor, torcida e por ser meu alicerce. Em especial à minha mãe, meu exemplo, amiga e companheira; obrigada por sempre acreditar em mim, por ser meu conforto e abrigo, estar ao meu lado, me dando força e conselhos; ajudou a superar as minhas decepções e aplaudir minhas conquistas. A meu pai (sempre presente) que é meu anjo e que eu tanto amo; só consegui porque tenho o senhor dentro de mim; sempre é presença constante a me iluminar, proteger e fortalecer.

Ao Ricardo, por estar ao meu lado em mais uma etapa, obrigada por entender meus momentos de ausência, me acalmar, proteger com sua presença, pelo amor e carinho por mim.

À Escola de Veterinária da UFMG, especialmente ao setor de Reprodução Animal, por me acolher, permitir a realização deste trabalho e contribuir para o meu crescimento.

À UFLA, pela minha formação em Medicina Veterinária.

Ao Prof. Alan Maia Borges, por ter me aceito como orientada de mestrado, acreditou e confiou em mim. Obrigada pelas conversas, incentivo, apoio, conhecimentos passados e pela amizade que fica. Sou grata por ter convivido com você todo esse tempo, exemplo de pessoa e profissional.

À equipe do Laboratório de Produção *in vitro* de Embriões: Carol, Victor, Luciano e Philipe, agradeço pelos conhecimentos passados, disposição em me ajudar e pela paciência comigo, não mediram esforços. À Eliane, nossa técnica e braço direito, o que seria de nós sem você nos ajudando nas rotinas de laboratório? Obrigada por tudo, por todos os momentos e amizade. À Alinne, esse presente que o RS me deu, veio para dividir comigo os momentos mais difíceis da conclusão desse trabalho, obrigada pela amizade doida e sincera, gaúcha, pelas madrugadas no frigorífico e por sempre me descontraír. Aos estagiários e alunos de iniciação científica que por lá passaram dando aquele apoio.

As amizades que fiz durante esse período: Ana Carolina e Virgínia, iniciamos juntas essa jornada e se não fosse nossa união acho que teríamos desistido. Obrigada pelos momentos, linda amizade, e pelas nossas conversas e infinitos desabafos. Foram essenciais para nos dar força e nos impulsionar sempre adiante. Às minhas calouras lindas: Juliana e Deborah, agradeço a presença e amizade constante, nossos “*happy hour*”, nossas conversas, nossos dias de compras e, enfim, obrigada por estarem sempre comigo. Amo vocês. Ao meu caro grande amigo, senhor Dário Dias, Dadá, Mascarado. O que dizer dele? Meu companheiro, obrigada por me receber tão bem no setor, pelas conversas, conselhos, pelos cafezinhos, tererés, cervejas e chopps. Como pode darmos tão certo, vou te levar sempre comigo. Ao Prof. Gabriel, Profa. Letícia e Prof. Pinho agradeço os ensinamentos passados e o companheirismo.

À Profa Marília Martins Melo, pelo empréstimo de equipamento para realização do estudo.

Agradeço de coração também as pessoas que conheci durante essa jornada, companheiros de pós e de casa que, de alguma forma, foram muito importantes na minha vida: Rosângela (Pote), José, Henry, Mirtha, Carol (Jéssica), Lays (Carioca), Andrine, Vinícius, Douglas. Ao enorme carinho e ajuda que recebi da graduação, especialmente, Walther, Yasmin, Tanara, Keith, Dara, Skarllete e Janaina. E a todos aqueles que, mesmo não citados aqui, de alguma forma me ajudaram.

Aos funcionários da Escola, pelo trabalho e consideração, em especial, Dona Vita, “Seu Márcio”, Cida, Valéria (técnica patologia), aos porteiros, principalmente os noturnos, agradeço a preocupação. Aos motoristas, por nos levar para as aulas à campo e tornar as viagens mais divertidas. A todos os demais funcionários que são essenciais para o funcionamento da Escola.

Aos frigoríficos Frigobet e Hipercarnes, pela disponibilidade em me receber para coleta dos ovários, especialmente à Eliza, Samuel, Emanuelle, William e demais funcionários que foram essenciais nesse processo.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos, a minha eterna gratidão.

Ao CAPI (Centro de Aquisição e Processamento de Imagens) da UFMG, pela utilização do microscópio confocal.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”

Mahatma Gandhi

## LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcentagem  
°C – Grau Celsius  
µg – Micrograma  
µL - Microlitro  
µM - Micromolar  
AC – Adenilato ciclase  
AMH – Hormônio anti-Mülleriano  
AMPc – adenosina monofosfato cíclico  
ATP – Adenosina trifosfato  
BSA – Albumina sérica bovina  
C<sub>60</sub> – Fulereno  
C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> – Fulerol  
CDC – Controle de divisão celular  
CDK – Quinases dependentes de ciclina  
CEEFs – Fatores de capacitação da expansão do *cumulus*  
CGPs - Células germinativas primordiais  
CIV – Cultivo *in vitro*  
C-MOS – Germ-cell-specific kinase  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono  
COCs – Complexo *cumulus oophorus*  
CP – Corpúsculo Polar  
CX43 – Connexin 43  
DEG – Degenerado  
ERK – Cinasas reguladas por sinal extracelular  
FIV – Fertilização *in vitro*  
FSH – Hormônio folículo estimulante  
GC – Grânulos corticais  
h - hora  
L – Litros  
LH – Hormônio luteinizante  
MAPK – Proteína cinase ativada por mitógenos  
MEK – Regulador de MAPK  
MF50 – Tratamento 50nM de fulerol  
mg – miligrama  
Mg(Cl<sub>2</sub>)<sub>6</sub>H<sub>2</sub>O – Cloreto de magnésio hexahidratado  
MI – Metáfase I  
MII – Metáfase II  
MIV – Maturação *in vitro*  
mL - mililitro  
mm – milímetro  
mM – milimolar  
MPF- Fator promotor de maturação  
NaCl – Cloreto de sódio  
NaOH – Hidróxido de sódio  
nM - Nanomolar  
NO – Óxido nítrico  
OH<sup>-</sup> - Radical hidroxila  
OMI – Fator inibidor da maturação oocitária  
PBS – *Phosphate Buffered Saline*  
PDEs – Fosfodiesterases



PIVE – Produção *in vitro* de embriões  
PKA – Proteína kinase A dependente de AMPc  
PVP – Álcool polivinílico  
QVG – Quebra de vesícula germinativa  
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro  
RNAr – Ácido ribonucleico ribossômico  
ROSC- Roscovitina  
SFB – Soro fetal bovino  
TBAH – Hidróxido de tetrabutilamônio  
TC – Tratamento controle  
TCM – *Tissue Culture Medium*  
TPZ – Projeções tranzonais  
VG – Vesícula Germinativa  
X – Vezes  
ZP – Zona pelúcida

---

## SUMÁRIO

---

LISTA DE TABELAS .....	11
LISTA DE FIGURAS .....	12
LISTA DE GRÁFICOS .....	14
RESUMO.....	15
ABSTRACT .....	16
1.Introdução .....	17
2.Revisão de Literatura.....	18
2.1 Foliculogênese.....	18
2.2 Oogênese .....	21
2.3 Maturação do Oócito.....	22
2.4 Maturação Nuclear .....	24
2.5 Maturação Citoplasmática.....	26
2.6 Bloqueadores de Meiose.....	27
2.7 Nanotecnologias .....	28
2.8 Fulerol, a nanopartícula de fulereno polihidroxilado .....	28
3.Material e Métodos.....	31
3.1 Síntese laboratorial do fulerol.....	31
3.2 Diluição do fulerol e confecção dos meios de maturação.....	31
3.3 Obtenção de complexos <i>cumulus-oophorus</i> (CCOs).....	32
3.4 Maturação <i>in vitro</i> (MIV) dos complexos <i>cumulus oophorus</i> .....	32
3.5 Avaliação da maturação nuclear dos oócitos.....	33
3.6 Avaliação da maturação citoplasmática dos oócitos .....	35
3.7 Análises Estatísticas .....	37
4.Resultados e Discussão.....	38
4.1 <i>Características dos oócitos bovinos maturados in vitro em meio controle ou suplementado de fulerol 50nM</i> .....	38
4.2 <i>Maturação nuclear de oócitos cultivados em meio MIV convencional ou suplementado com fulerol 50nM</i> .....	41
4.3 <i>Maturação citoplasmática de oócitos cultivados em meio MIV convencional ou suplementado com fulerol 50nM</i> .....	49
4.4 <i>Maturação nuclear e citoplasmática de oócitos cultivados em meio MIV convencional ou suplementado com fulerol 50nM</i> .....	51
5.Conclusões.....	55
6.Perspectivas Futura.....	55
7.Referências Bibliográficas.....	56

---

LISTA DE TABELAS

---

- Tabela 1.** Percentual das diferentes configurações cromossômicas (maturação nuclear) de oócitos bovinos cultivados *in vitro* em condições convencionais (TC; n=300) ou suplementados com fulerol 50nM (MF50; n=270).....41
- Tabela 2.** Percentual de oócitos bovinos imaturos ou maduros sob condições de cultivo *in vitro* em meio convencional (TC; n=197) ou suplementado com fulerol 50nM (MF50; n=159), ao longo das horas de incubação (P>0,05).....49
- Tabela 3.** Percentual de oócitos do tratamento controle cultivados *in vitro* e avaliados conjuntamente quanto à maturação nuclear e citoplasmática. .... 51
- Tabela 4.** Percentual de oócitos do tratamento Fulerol 50nM cultivados *in vitro* e avaliados conjuntamente quanto à maturação nuclear e citoplasmática..... 51
-

---

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1.** Imagem tridimensional de oócito bovino destacando os prolongamentos das células da granulosa do *cumulus oophorus* atravessando a zona pelúcida até o oolema (Adaptado de Knobil and Neill's, 2014).....21
- Figura 2.** Esquema representativo dos mecanismos envolvidos na maturação oocitária (Adaptado de Dekel, 2005).....24
- Figura 3.** Estrutura da molécula de fulereno C<sub>60</sub>, com 60 átomos de carbono formando um polígono de 60 vértices e 32 faces, 12 pentagonais e 20 hexagonais (Adaptado de Lichota e Krokosz, 2016).....29
- Figura 4.** Estrutura do fulereno polihidroxilado ou fulerol (C<sub>60</sub>OH<sub>22-24</sub>) (Adaptado de Lichota e Krokosz, 2016).....30
- Figura 5.** Fotomicrografias obtidas em microscópio de fluorescência das diversas fases da maturação nuclear de oócitos bovinos corados com Hoechst 33342. (A) Oócito em vesícula germinativa (VG - Prófase I da meiose): cromossomos descondensados; (B) Quebra da vesícula germinativa (QVG); (C) Oócito em metáfase I: cromossomos altamente condensados; (D) Oócito em metáfase II: cromossomos condensados na placa metafásica e extrusão do primeiro corpúsculo polar (E) Oócito degenerado: retração oocitária e ausência de núcleo (Aumento de 400x).....34
- Figura 6.** Imagens de microscopia do plano equatorial dos oócitos bovinos mostrando o padrão de distribuição citoplasmática das mitocôndrias marcadas com o MitoTracker Orange. (A) Oócitos imaturos com padrão homogêneo (A1) e distribuição periférica de mitocôndrias (A2); (B) Padrão heterogêneo em oócitos maturados. (Aumento de 400x). .....36
- Figura 7.** Oócitos bovinos. Fotomicrografia representativa da microscopia de fluorescência demonstrando oócitos na fase de Metáfase II. (A) Padrão de distribuição das mitocôndrias no interior do ooplasma (heterogêneo) coradas com Mitotracker Orange; (B) Marcação da cromatina com Hoechst 33342, diferenciando os cromossomos condensados e a extrusão do corpúsculo polar (C) Sobreposição das imagens (Aumento de 400x). .....37
-

<b>Figura 8.</b> Oócitos bovinos durante as horas da maturação in vitro (aumento 40X), em função dos tratamentos controle e suplementado com fulerol 50nM.....	39
<b>Figura 9.</b> Oócitos bovinos corados por Mitotracker Orange e Hoechst durante as horas da maturação in vitro (aumento 400X), para os grupos Controle e Fulerol 50nM.....	40
<b>Figura 10.</b> Distribuição percentual dos diferentes estádios (A= vesícula germinativa; B= quebra da vesícula germinativa; C= metáfase I; D= metáfase II) da maturação nuclear e de degeneração oocitária (E) de oócitos bovinos cultivados in vitro em meio convencional ou contendo 50nM de Fulerol, em função das horas de incubação. Dados analisados pelo Teste Exato de Fisher (GraphPad InStat 3.06) a 5% de significância. *P<0,05; ** P=0,08.....	47
<b>Figura 11.</b> Avaliação temporal da maturação nuclear e citoplasmática in vitro de oócitos bovinos dos tratamentos controle e fulerol 50nM. ....	52

---

---

## LISTA DE GRÁFICOS

---

- Gráfico 1.** Taxa de maturação in vitro de oócitos bovinos (n=300) do grupo controle, em relação às horas após o início da incubação. VG = vesícula germinativa, QVG = quebra da vesícula germinativa, MI = metáfase I, MII = metáfase II, DEG = degenerados. ....42
- Gráfico 2.** Taxa de maturação in vitro de oócitos bovinos (n=270), em relação às horas após o início da incubação em meio contendo 50nM de Fulerol. VG = vesícula germinativa, QVG = quebra da vesícula germinativa, MI = metáfase I, MII = metáfase II, DEG = degenerados.....44
- Gráfico 3.** Distribuição percentual de oócitos imaturos (distribuição mitocondrial homogênea + periférica) ao longo das horas de cultivo em condições convencionais (meio controle) ou em meio suplementado com fulerol 50nM (\*P<0,05).....50
- Gráfico 4.** Distribuição percentual de oócitos maduros (distribuição mitocondrial heterogênea) ao longo das horas de cultivo em condições convencionais (meio controle) ou em meio suplementado com fulerol 50nM. \*P<0,05.....50
-

## RESUMO

A eficiência da maturação *in vitro* (MIV) de oócitos está intimamente relacionada com a competência bioquímica, intrínseca ao desenvolvimento do oócito e sua posterior fecundação. Os meios de MIV tem sido suplementados e testados afim de melhorar o potencial oocitário para a produção *in vitro* de embriões (PIVE). No presente estudo objetivou-se avaliar, *in vitro*, a dinâmica da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos cultivados em meio MIV suplementado com fulerol. O fulerol é uma nanomolécula derivada da polihidroxilação do fulereno, é estável e formado exclusivamente por átomos de carbono, e tem sido utilizado em algumas áreas biológicas devido sua atividade antioxidante, quando em concentrações mais baixas. Nesse trabalho objetivou-se avaliar se o fulerol é capaz de bloquear a retomada da meiose de oócitos bovinos maturados *in vitro*. Foram utilizados dois meios de MIV: no tratamento controle (TC), meio utilizado foi o TCM 199 bicarbonato; e o segundo tratamento, com meio TCM 199 bicarbonato suplementado com 50nM de fulerol (MF50). Os oócitos foram maturados por 24 horas em estufa a 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. A avaliação da maturação nuclear do TC (n=300) e MF50 (n=270) foi realizada a cada 6 horas, durante 36 horas, por meio da coloração dos oócitos com Hoechst 33342. Foram identificados os seguintes estádios: vesícula germinativa (VG), quebra da vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) e metáfase II (MII). Na maturação citoplasmática avaliou-se oócitos do TC (n=197) e MF50 (n=159) a cada 12 horas, durante 36 horas, corados com Mitotracker Orange (Life<sup>®</sup> Technologies, Carlsbad, CA, USA), de acordo com a distribuição citoplasmática das mitocôndrias. Durante a experimentação verificou-se dificuldade de desnudamento dos oócitos expostos ao fulerol 50nM como uma informação observacional. De maneira descritiva, a partir de 6 horas, observou-se retardo na maturação nuclear dos oócitos do grupo MF50. Às 6 horas, oócitos do TC (19%) se encontravam em MI, enquanto no MF50 estavam em VG ou QVG, o que também ocorreu com 12 horas. Já às 18 horas, enquanto 46,3% dos oócitos já estavam maturados no TC (oócito em estágio MII), em MF50 o percentual foi de 20%. Com 24 horas de maturação, verificou-se 43,9% de maturação no grupo MF50, quando comparado com 63,8% no controle. Às 30 e 36 horas, o padrão de maturação foi estável, contudo, foi identificado início de degeneração dos oócitos. Com relação à maturação citoplasmática, houve retardo da mesma com 36 horas de maturação (P<0,05) no grupo MF50 (53,9%), comparado ao tratamento controle (69,8% de gametas maduros). E em relação aos oócitos com citoplasma imaturo, foram encontrados 10,4% e 31,7% para o TC e MF50 (P<0,05), respectivamente. Conclui-se que a adição de 50nM de fulerol ao meio de maturação *in vitro* possivelmente interferiu no mecanismo de expansão das células do *cumulus oophorus*, bem como retardou a progressão meiótica e a maturação citoplasmática dos oócitos.

**Palavras-chave:** bloqueador de meiose, fulerol, maturação oocitária *in vitro*, oócitos bovinos.

## ABSTRACT

The efficiency of *in vitro* maturation (IVM) of oocytes is closely related to biochemical competence, intrinsic to the development of the oocyte and subsequent fertilization. IVM medium is supplemented in order to test and improve the oocyte potential for *in vitro* embryo production (IVEP). This study aimed to evaluate, *in vitro*, the dynamics of nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes cultured in IVM medium supplemented with fullerol. Fullerol is a nanomolecule derived from fullerene polyhydroxylation, it is stable and formed exclusively by carbon atoms. It is being used in some biological areas due to its antioxidant activity at lower concentrations. This study aimed to evaluate whether fullerol is able to block the resumption of meiosis in bovine oocytes matured *in vitro*. Two MIV media were used: the control treatment (CT), TCM 199 bicarbonate medium; and treatment with TCM 199 bicarbonate medium supplemented with 50nM fullerol (MF50). The oocytes were matured for 24 hours in a incubator at 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity. The evaluation of nuclear maturation of CT (n = 300) and MF50 (n = 270) was performed every 6 hours, for 36 hours, by staining the oocytes with Hoechst 33342 and identifying the following stages: germinal vesicle (GV), breakdown of the germinal vesicle (GVB), metaphase I (MI) and metaphase II (MII). At cytoplasmic maturation, oocytes from CT (n = 197) and MF50 (n = 159) were evaluated every 12 hours, for 36 hours, stained with Mitotracker Orange (Life<sup>®</sup> Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to cytoplasmic distribution of mitochondria. During the experimentation, there was difficulty in stripping the oocytes exposed to 50nM fullerol, as an observational information. Descriptively, after 6 hours of incubation, a delay in the nuclear maturation of the oocytes of the MF50 group was observed. At 6 hours of maturation, oocytes of the CT (19%) were in MI, while the MF50 were in GV or GVB, which also occurred with 12 hours. At 18 hours, while 46.3% of oocytes were matured on CT (oocyte in stage MII), on MF50 the percentage was 20%. Within 24 hours of maturation, it was observed 43.9% and 63.8% of matured oocytes for MF50 and CT groups, respectively. At 30 and 36 hours, the pattern of maturation was stable, but degenerate oocytes were identified. Regarding cytoplasmic maturation, there was a delay of 36 hours of maturation (P<0.05) in the MF50 group (53.9%) compared to the control group (69.8% of mature gametes). In relation to cytoplasmic immature oocytes, they were 10.4% for CT and 31.7% for MF50 (P<0.05). It is concluded that the addition of 50nM fullerol to the *in vitro* maturation medium possibly interfered in the expansion mechanism of *cumulus oophorus* cells, as well as delayed meiotic progression and cytoplasmic maturation of oocytes.

**Keywords:** bovine oocytes, fullerol, meiosis inhibition, *in vitro* oocyte maturation.



## 1. Introdução

*In vivo*, a fertilidade depende da viabilidade e capacidade de desenvolvimento do oócito até próximo da ovulação, quando completa sua maturação por meio da retomada da meiose, progredindo da prófase I para a metáfase II. A progressão meiótica é essencial para a fecundação e envolve mudanças no equilíbrio de fatores que bloqueiam ou estimulam a meiose e a maturação do oócito (Jamnongjit e Hammes, 2006). Durante o crescimento folicular e do oócito é necessário a estimulação pelas gonadotropinas hipofisárias, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). A maturação do oócito requer interação de fatores intracelulares, parácrinos e estruturais, tais como esteróides, fatores de crescimento, adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e, também, as junções do tipo *Gap* existentes entre as células foliculares (Jamnongjit e Hammes, 2006).

Da mesma forma, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) depende da inseminação dos oócitos viáveis, maduros e competentes em desenvolverem até embriões para que esses sejam, então, transferidos para as fêmeas receptoras. A redução da competência oocitária prejudica a produção de blastocistos que, apesar da variabilidade dos resultados entre sistemas comerciais de produção *in vitro*, variam de 40 a 50% (Watson, 2007). Nesses sistemas *in vitro*, a maturação dos oócitos (MIV) é uma importante etapa da biotecnia reprodutiva que visa a obtenção de oócitos maduros, a partir de complexos *cumulus oophorus* (COCs) removidos mecanicamente de folículos antrais, após aspiração folicular guiada por ultrassonografia ou de ovários de abatedouro. Na maturação, os oócitos são cultivados por 24 horas até atingirem a metáfase II quando, então, se tornam aptos para serem fecundados e possam se desenvolver em embriões. Os oócitos maturados *in vitro* são, em sua maioria, meioticamente competentes, porém, variações nos meios de cultura podem influenciar o desenvolvimento embrionário, de modo alterar o número de células dos blastocistos e a taxa de apoptose (Watson, 2007). Por isso, é necessário o entendimento do processo de maturação *in vitro* dos oócitos (Gilchrist e Thompson, 2008).

A eficiência da maturação *in vitro* está intimamente relacionada com a competência bioquímica, intrínseca ao desenvolvimento do oócito. Diferentemente do processo *in vivo*, a maturação *in vitro* se processa de duas formas: primeiro, os COCs são geralmente coletados de folículos antrais de tamanhos médios e que não completaram sua capacitação e, portanto, não possuem o maquinário molecular e celular necessário para suportar a embriogênese precoce; e segundo, a remoção mecânica dos COCs do folículo resulta na perda da inibição meiótica, culminando na retomada espontânea da meiose e na maturação do oócito *in vitro* (Gilchrist e Thompson, 2008).

Um dos grandes desafios para o incremento dos resultados da produção *in vitro* de embriões é compreender o mecanismo que confere competência para o oócito se desenvolver, incluindo o papel

desempenhado pelo ambiente folicular *in vivo*. O entendimento da dinâmica do processo de maturação visa obter mecanismos para modificar e incrementar a qualidade dos meios de maturação *in vitro*, que resulte em maior taxa de produção de blastocistos. Diante do contexto, os meios de MIV têm sido suplementados e testados para melhorar o potencial oocitário para a PIVE. Uma das últimas tecnologias que tem sido testadas é a nanotecnologia, que vem ganhando notoriedade em várias pesquisas científicas, principalmente nas áreas biológicas e médicas.

Ladeira *et al.* (2013) verificaram a propriedade antioxidante do fulerol para a área médica, em disfunções cardiovasculares induzidas por estresse oxidativo. Como o ambiente *in vitro* para a produção de embriões possui alta concentração de espécies reativas ao oxigênio, recentemente, Prata (2019) desenvolveu estudo para avaliar o efeito da adição da nanopartícula fulerol ao meio de maturação *in vitro* de embriões bovinos, em diferentes concentrações, sobre as taxas de produção e qualidade dos embriões produzidos. Prata (2019) concluiu que a adição de fulerol não alterou as taxas de clivagem e produção de blastocistos, porém, na maior concentração, de 50nM, reduziu a taxa de células apoptóticas dos blastocistos produzidos *in vitro*. Diante dessa concentração, o autor também pôde observar maior quantidade de oócitos não maturados em relação aos demais tratamentos, após 24 horas de maturação *in vitro*, o que leva a supor que o fulerol poderia ter provável efeito bloqueador de maturação nuclear *in vitro*, quando usado em concentrações mais elevadas.

O objetivo do presente estudo foi descrever a dinâmica da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos cultivados *in vitro* em meio suplementado com 50nM de fulerol, de modo testar a hipótese que essa nanopartícula possa ser usada como bloqueador reversível da meiose, retardando a retomada da meiose de oócitos removidos mecanicamente dos folículos antrais.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1 Foliculogênese

O desenvolvimento folicular em espécies monovulares, tais como os bovinos, é caracterizado pelas fases de recrutamento de folículos primordiais, durante longo período de crescimento folicular, e a seleção de um folículo dominante destinado à ovulação ou atresia (Trounson *et al.*, 2001). A cada início do ciclo reprodutivo, um grupo de folículos primordiais é recrutado no ovário de mamíferos, para iniciarem a fase de crescimento, mas apenas um completará o ciclo e será ovulado (Zuccotti *et al.*, 2011).

A reserva de folículos primordiais está geralmente em estado de repouso, e não em desenvolvimento, que consiste na transição do folículo primordial para o primário. Eles são a unidade funcional básica do ovário, compostos pelo oócito em desenvolvimento e de células somáticas,

compostas por células da teca e da granulosa. A proliferação das mesmas é, em parte, responsável pela formação do folículo antral (Skinner, 2005).

Somente as últimas fases da oogênese, durante o crescimento folicular e a maturação de oócitos, são dependentes de gonadotropinas, enquanto os eventos iniciais parecem ser dependentes da expressão de fatores de crescimento, bem como das interações das células germinativas com seu ambiente folicular (Eichenlaub-Ritter e Peschke, 2002). Durante o crescimento, os folículos adquirem habilidade de produzir estradiol, hormônio que irá estimular o folículo a expressar receptores de LH, necessários para a ovulação e luteinização, além de responderem às gonadotropinas. Caso ocorra algum distúrbio nessa fase ocorrerá finalização do crescimento e início da atresia (Hafez, 1995).

Os folículos primordiais permanecem quiescentes até próximo da puberdade, quando os ovários se tornam responsivos aos hormônios gonadotrópicos (Eichenlaub-Ritter e Peschke, 2002). Um fator que demonstrou inibir, mas não bloquear completamente o recrutamento dos folículos primordiais, foi o hormônio anti-Mülleriano (AMH). Ele é derivado de folículos em desenvolvimento (secundários, pré-antrais e antrais), não é expresso no folículo primordial, mas parece bloquear o desenvolvimento folicular. Ao contrário, um fator estimulatório do desencolcimento folicular seria a ativina-A (Durlinger *et al.*, 2002). A entrada dos folículos primordiais na fase de crescimento ocorre durante todo o período reprodutivo, e estudos morfométricos sugerem que esses folículos iniciam o crescimento com base na ordem hierárquica de sua formação inicial (Hirshfield, 1991).

Os mecanismos responsáveis pelo início do crescimento folicular são pouco compreendidos, embora algumas moléculas candidatas (gonadotropinas, fatores de crescimento, moléculas como o *kit* ligante, e seu receptor *c-kit*) tenham sido consideradas importantes no processo de desenvolvimento folicular (Webb *et al.*, 1999).

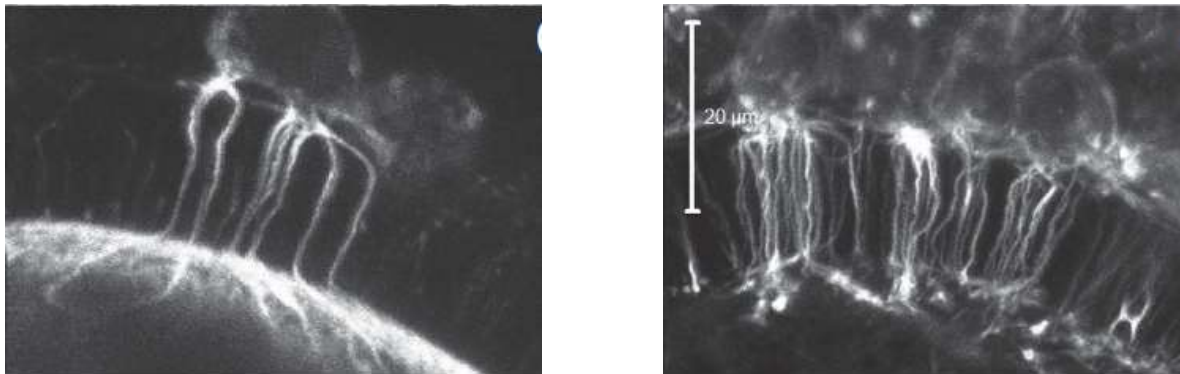
Dentro do folículo, o oócito é cercado por uma camada de células somáticas, conhecidas por células da pré-granulosa (Juengel *et al.*, 2002). A transição dos folículos estáticos para em crescimento é caracterizada pela modificação morfológica dessas células, de simples pavimentosas para uma única camada de células cuboidais, que torna o folículo primário (Kanitz *et al.*, 2001).

As células da granulosa sintetizam dois importantes hormônios esteróides, o estradiol (E2) e a progesterona. À medida que o folículo desenvolve, as células da granulosa se diferenciam e a produção de estrógeno aumenta. O FSH promove este desenvolvimento folicular por meio das ações do AMPc. Nos estádios antes da ovulação, o folículo também aumenta a capacidade de sintetizar e secretar progestágenos sob o controle de LH. Inicialmente, os folículos primordiais são gonadotropina e hormônio esteróide independente (Oktay *et al.*, 1997; Skinner, 2005).

Quando duas ou mais camadas de células da granulosa se desenvolvem, os folículos se tornam secundários e compreendem o último estágio pré-antral. Nessa fase, o oócito entra na etapa de maior duração de crescimento, as células da granulosa circundantes se tornam proliferativas, e uma camada de células da teca se desenvolve em torno das células da granulosa, a partir de células do estroma intersticial. Os folículos se tornam irrigados por uma ou duas arteríolas com capilares, fora da membrana basal, e esse suprimento sanguíneo permite que o folículo seja exposto aos fatores hormonais circulantes e, à medida que os folículos secundários aumentam de tamanho, as células estromais, próximas à membrana basal, se diferenciam e formam a teca interna e externa (Kanitz *et al.*, 2001). A principal função desse tipo celular é a produção de andrógenos, por meio do estímulo do LH, aumentando a produção de andrógenos a partir de colesterol e, assim, como são capazes de produzir progestágenos sob controle de gonadotropinas (Skinner, 2005).

Para que ocorra a fecundação e posterior clivagem das células embrionárias, os oócitos precisam crescer, proliferar, maturar, diferenciar e se tornarem competentes na retomada da maturação nuclear. Uma das mudanças mais importantes, durante a fase de crescimento do oócito, é a secreção de três glicoproteínas (ZP1, ZP2 e ZP3) que constituirão a zona pelúcida (Hurk e Zhao, 2005). Posteriormente, as células da granulosa se agrupam e mantêm íntimo contato entre si, por meio de junções tipo *Gap* e por prolongamentos que chegam ao oolema do oócito, atravessando a ZP em desenvolvimento, como mostrado na Figura 1 (Anderson e Albertini, 1976). Essas junções facilitam a comunicação bidirecional e permitem a transferência de nutrientes, metabólitos (aminoácidos e nucleotídeos), moléculas informativas (hormônios, neurotropinas e fatores de crescimento) e sinalizadores inibidores da meiose, além de agentes estimuladores. Pelas junções *Gap* ou por contato direto célula-célula, o oócito em crescimento pode promover ativamente o crescimento e a diferenciação das células foliculares, enquanto, inversamente, as células da granulosa são capazes de garantir o crescimento e a diferenciação do oócito (Hurk e Zhao, 2005).

Durante o crescimento folicular, a formação da cavidade antral, entre as células da granulosa, permite que o fluido folicular seja importante fonte de substâncias reguladoras ou moduladoras derivadas do sangue ou de secreções das células foliculares, tais como gonadotropinas, esteróides, fatores de crescimento, enzimas, proteoglicanos e lipoproteínas. Durante o desenvolvimento folicular, a produção de líquido antral é intensificada pelo aumento da vascularização e permeabilidade dos vasos sanguíneos (Hurk e Zhao, 2005).



**Figura 1.** Imagem tridimensional de oócito bovino destacando os prolongamentos das células da granulosa do *cumulus oophorus* atravessando a zona pelúcida até o oolema (Adaptado de Knobil and Neill's, 2014).

## 2.2 Oogênese

A oogênese, processo de formação do gameta feminino, compreende a formação das células germinativas primordiais (CGPs), migração das CGPs para as gônadas, colonização das gônadas pelas CGPs, diferenciação das CGPs em oôgonias, proliferação das oôgonias, início da meiose e bloqueio no estágio diplóteno da prófase I da meiose (Hurk e Zhao, 2005).

As CGPs, durante a vida fetal, proliferam por mitose e migram a partir do endoderma do saco vitelino para a região da crista gonadal. A migração em direção às gônadas em desenvolvimento é baseada inicialmente no transporte passivo e, posteriormente, em movimento amebóide em resposta a substâncias quimiotáticas (McGee *et al.*, 1998; Kanitz *et al.*, 2001).

Após a migração, as CGPs perdem a motilidade e diferenciam-se em oogônias, que se multiplicam por mitose (Kanitz *et al.*, 2001). Após essa proliferação mitótica elas iniciam a primeira divisão meiótica e ficam bloqueadas no estágio de prófase da primeira divisão meiótica até a puberdade, e são denominadas de oócitos primários (Hurk *et al.*, 1997). Essa fase é denominada de crescimento, pois ocorre aumento do citoplasma e acúmulo de nutrientes na célula (Oliveira, 2009).

Os mecanismos responsáveis por esse bloqueio ainda não foram totalmente elucidados, porém, acredita-se que se baseia em fatores como a regulação e ativação do fator promotor da maturação (MPF), adenosina monofosfato cíclica (AMPc), inibidor da maturação do oócito (OMI), íons cálcio produzidos pelas células foliculares e das proteínas C-MOS (germ-cell-specific kinase) e MAPK (mitogen-activated kinase protein) (Guerra, 2001).

Os oócitos primários são arredondados e ficam rodeados por uma camada de células da granulosa achatadas, dentro de folículos primordiais. O crescimento do folículo primordial envolve aumento no tamanho do oócito, formação da zona pelúcida (ZP) ao redor do oócito, e divisão mitótica das células da granulosa. Todos esses processos de crescimento são aparentemente independentes da

influência das gonadotropinas, e podem ocorrer a qualquer momento após a formação do folículo primordial. O crescimento contínuo, no entanto, pode ser alcançado somente sob ação do FSH sobre as células da granulosa, que proporciona a continuação de divisões celulares e a formação do líquido folicular, derivado do soro sanguíneo, que se acumula as células, formando o antro. Nesta fase, o oócito é circundado por várias camadas de células da granulosa, que mudam sua forma para se desenvolverem em *cumulus oophorus*. A liberação do oócito do folículo antral plenamente desenvolvido é desencadeado após a onda LH (Homa, 1995).

A diferenciação dos oócitos imaturos (primários) para os maduros (secundários) tem início na puberdade e, a cada 21 dias, em média para os bovinos, um oócito conclui a primeira divisão meiótica iniciada na vida fetal (Hafez, 1995).

O oócito primário reinicia a meiose, também chamada de maturação, sob sinalização bioquímica e hormonal. Ele completa a primeira divisão e dá origem a duas células haplóides, o oócito secundário e o primeiro corpúsculo polar (CP) que logo degenera. O oócito secundário terá novo bloqueio na fase de metáfase II e só completará a divisão caso haja fecundação, levando a formação do segundo corpúsculo polar. O gameta só completa o desenvolvimento se atingir tamanho apropriado e, caso contrário, eles param ou atingem somente a meiose I (Guerra, 2001).

A fecundação só é possível em oócitos competentes que atingiram a completa maturação, nuclear e citoplasmática que, apesar de serem processos complexos e distintos, ocorrem simultaneamente (Oliveira, 2009).

### **2.3 Maturação do Oócito**

Nos oócitos de mamíferos, a meiose é iniciada na fase fetal e, do nascimento à ovulação ou à atresia, torna-se bloqueada na primeira divisão meiótica. A retomada da divisão celular ocorre após o pico de LH ou, também, após remoção do oócito do folículo antral quando, então, completam a meiose até a metáfase II até que ocorra a fecundação (Bilodeau-Goeseels, 2003).

O crescimento e a maturação do oócito, durante a foliculogênese e oôgenese, dependem da comunicação do gameta com as células foliculares, mais precisamente com as células do *cumulus oophorus* (Rybska *et al.*, 2018). A comunicação intercelular das células da granulosa é promovida pelas junções do tipo *Gap*, que permitem ao oócito a aquisição de competência para maturação nuclear e citoplasmática (Dedieu *et al.*, 1996; Carabatsos *et al.*, 2000).

A maturação completa dos oócitos é essencial para a competência de desenvolvimento posterior dos embriões. Assim, quaisquer alterações que ocorrerem durante o crescimento folicular e do oócito afetarão a maturação, a fecundação e, conseqüentemente, o desenvolvimento embrionário (Trounson

*et al.*, 2001). Os oócitos totalmente desenvolvidos e bloqueados na prófase I são competentes para retomarem a divisão meiótica. Esse bloqueio nos folículos ovarianos é mantido por fatores inibitórios produzidos pelo mesmo (Hashimoto *et al.*, 2002).

Os mecanismos que controlam a maturação nuclear não são totalmente compreendidos. Contudo, o monofosfato de adenosina cíclica (AMPC) desempenha papel importante, haja vista que a elevação na concentração de AMPC, quando o complexo *cumulus oophorus* e folículos estão íntegros, inibe a maturação nuclear (Bilodeau-Goeseels, 2003; Eyers *et al.*, 2005). O AMPC consiste em um nucleotídeo sintetizado no interior das células, a partir da adenosina trifosfato (ATP), pela enzima adenilato ciclase (AC). O AMPC é continuamente produzido e degradado por hidrólise pela ação das fosfodiesterases (PDEs) (Richard, 2007). Sua produção nos oócitos ocorre em resposta a um ligante gerado pelas células da granulosa, que ativa as proteínas G ligadas à membrana que estimula a AC (Sela- Abramovich *et al.*, 2006).

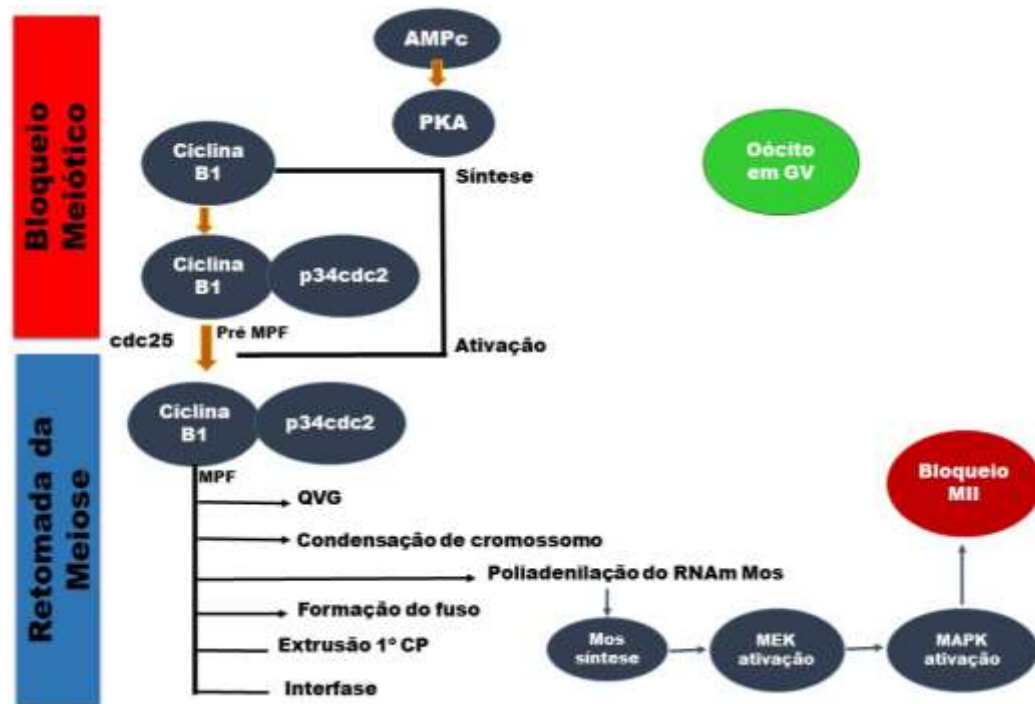
O LH estimula o aumento de AMPC no folículo, o que desencadeia a maturação oocitária, porém, esse aumento intra-oocitário inibe esse mecanismo. A alta concentração de AMPC ativa a PKA do tipo I mantendo o bloqueio meiótico. Existe a teoria de que o AMPC inibitório é produzido nas células da granulosa e, então, transferido para o oócito via junções tipo *Gap*, mantendo o bloqueio meiótico (Dekel, 2005; Sela- Abramovich *et al.*, 2006).

A proteína kinase A (PKA), dependente de AMPC, também mantém o bloqueio meiótico e é ativada pelo aumento de AMPC. Existem dois tipos: o tipo I inicialmente mantém o oócito em estágio de VG, com elevação dos níveis de AMPC; já o tipo II estimula mecanismo que resulta na diminuição do AMPC e quebra da vesícula germinativa (QVG). Com a diminuição das concentrações intraoocitárias de AMPC e PKA, ocorre a ativação do fator promotor de maturação (MPF) e da via da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) e, conseqüentemente, ocorre a QVG e início da condensação cromossômica (Dekel, 2005).

Com a remoção mecânica dos CCOs dos folículos antrais ou após o pico de LH, ocorrem mecanismos de rompimento das junções tipo *Gap* com diminuição nas concentrações de AMPC intracelulares, possibilitando a retomada da meiose (Bilodeau-Goeseels, 2003; Eyers *et al.*, 2005).

A figura 2 contém os mecanismos da maturação do oócito. P34cdc2 e ciclina B1 são proteínas que compõem o MPF e formam um heterodímero, inicialmente inativo (pré-MPF). Ele é ativado pela cdc25 fosfatase, após desfosforilação de p34cdc2. O AMPC inibe a desfosforilação de MPF e a síntese de ciclina B, diminuindo o pré-MPF. A PKA ativa fosforilação de MPF inativando-o, impedindo a retomada da meiose. Em resposta ao LH ou remoção do oócito, a concentração intraoocitária de AMPC cai e ocorre ativação de MPF desencadeando a QVG, a condensação cromossômica e a

formação de eixos. A atividade do MPF também estimula a poliadenilação do RNAm Mos, levando a síntese da proteína cinase Mos que ativa MAPK por meio de MEK (regulador de MAPK). A inativação do MPF na MI é necessária para a conclusão da primeira divisão meiótica e extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP), enquanto sua reativação suprime a interfase, garantido a transição para metáfase II (MII). A parada em MII permanece até a fecundação (Sutton *et al.*, 2003; Dekel, 2005).



**Figura 2.** Esquema representativo dos mecanismos envolvidos na maturação oocitária (Adaptado de Dekel, 2005).

Além disso, também foi verificada a existência de um polipeptídeo no fluido folicular, o fator inibidor da maturação oocitária (OMI), que é sintetizado e secretado pelas células da granulosa. Estudos propuseram que ele é um dos fatores que impedem a maturação espontânea do oócito *in vivo* (Sirard *et al.*, 1998). À medida que os folículos se desenvolvem e aumenta a concentração de LH, diminui as concentrações de OMI, pois há interrupção da secreção pelas células. Sua ação requer a presença das células do *cumulus oophorus* (Centola *et al.*, 1981).

## 2.4 Maturação Nuclear

A maturação nuclear do oócito envolve a QVG e a progressão da meiose da MI até a parada na MII. Esse processo é regulado pela ação coordenada de duas cinases, o MPF e MAPK. A importância do MPF na maturação de oócitos de mamíferos está bem estabelecida, enquanto o papel da MAPK,



embora bem compreendido em oócitos de camundongos, não foi totalmente elucidado em oócitos das espécies domésticas, como no caso de bovinos (Gordo *et al.*, 2001).

Os oócitos desenvolvem, primeiramente, a capacidade de ativar o MPF e, posteriormente, ocorre a via da MAPK. Porém, somente aqueles que completarem o crescimento é que possuirão a competência para ativarem essa função (Gottardi e Mingoti, 2009).

A cinética das atividades do MPF e da MAPK são diferentes durante as etapas da maturação oocitária. A atividade de MAPK permanece alta durante a transição da MI para a MII e, contrariamente, a atividade do MPF diminui durante a transição anáfase-telófase, e aumenta novamente na MII (Dedieu *et al.*, 1996). O MPF é ativado por meio da fosforilação e desfosforilação protéica (Dekel, 1996). Quando presente no meio *in vivo* ocorre no início da maturação dos oócitos, em resposta ao pico endógeno do LH. Contudo, nos sistemas *in vitro* retomam a maturação meiótica espontaneamente após sua remoção do folículo ovariano (Trounson *et al.*, 2001).

A ativação do MPF é um processo de duas etapas que compreende a formação do complexo entre a subunidade cinase (p34cdc2) e a subunidade reguladora (ciclina B). Quando formado, esse complexo pode ser ativado por desfosforilação da treonina 14 e resíduos de tirosina 15 da subunidade p34. Assim, em bovinos, a ativação do MPF requer tanto neossíntese protéica quanto cascatas de fosforilação/desfosforilação (Mermillod *et al.*, 2000). Verificou-se que a atividade do MPF foi detectada pouco antes ou concomitantemente com a QVG, aumentando até a metáfase I e diminuindo durante a transição anáfase para telófase. A atividade aumenta novamente até o oócito atingir a metáfase II. A inativação do MPF ocorre na transição da metáfase I para a anáfase I, na fecundação e na ativação paternogênica (Trounson *et al.*, 2001).

Segundo Gordo *et al.* (2001), em estudo com oócitos caprinos, após a liberação do primeiro corpúsculo polar, a atividade do MPF diminuiu gradualmente e foi indetectável com  $22 \pm 26$  horas de maturação.

As MAPK são outro grupo de proteínas envolvidas na maturação nuclear do oócito. As cinases reguladas por sinal extracelular são denominadas ERKs 1 e 2 (ERK 1/2). Todas as células eucarióticas possuem múltiplas vias MAPK que regulam, coordenadamente, diversas funções celulares e, dentre elas, a expressão gênica, mitose, metabolismo, sobrevivência, apoptose e diferenciação celular (Roux e Blenis, 2004). As MAPK pertencem à família das serina/treonina cinases e estão associadas às citocinas e eventos citoplasmáticos, incluindo a regulação da dinâmica dos microtúbulos, formação do fuso meiótico e condensação cromossômica (Dedieu *et al.*, 1996). A ativação de MAPK desencadeia a fosforilação de proteínas que origina o envelope nuclear e as que participam da condensação e reorganização do citoesqueleto (Trounson *et al.*, 2001).

Popelková *et al.* (2006) demonstraram que MAPK desempenham papel na transdução de sinais extracelulares para respostas celulares, e acredita-se desempenhar importante papel durante a maturação meiótica de oócitos dos vertebrados. A atividade da MAPK, em oócitos cultivados *in vitro*, aumenta gradualmente após oito horas, atinge o máximo após 12–14 horas, e permanece estável até 24 horas de maturação. Tanto o ERK1 quanto o ERK2 são ativados por fosforilação próximo ao rompimento da vesícula germinativa (Kubelka *et al.*, 2000).

A maior atividade de MPF, as concentrações de MAPK, e as diferentes organizações dos microtúbulos de oócitos estacionados na fase QVG sugerem que exista estreita relação da organização de microtúbulos e atividade MAPK (Dedieu *et al.*, 1996).

O início e a progressão da meiose são acompanhados pela ativação e aumento da atividade do MPF, embora ela não seja estável na ausência de MAPK. Também tem sido verificado que a morfologia do fuso meiótico é regulada por MAPK. Estes resultados demonstram que, em bovinos, a MAPK de oócitos não é crítico para a retomada da meiose e ativação do MPF, mas desempenham papel expressivo na manutenção do bloqueio de MII, na atividade do MPF, e nas configurações normais do fuso meiótico (Gordo *et al.*, 2001).

Quando atingem a fase de metáfase II, caracterizada pela extrusão do primeiro CP, os oócitos se tornam células haploides e, a partir desse momento, sofrem outro bloqueio e permanecerão até a fecundação pelo espermatozoide quando, então, completam a divisão meiótica (Rybska *et al.*, 2018).

## 2.5 Maturação Citoplasmática

A maturação citoplasmática do oócito é influenciada por moléculas e estruturas que serão necessárias em estádios subsequentes, determinando o sucesso da fecundação e divisão mitótica do embrião (Rybska *et al.*, 2018). Ela pode ser dividida em três eventos principais: (1) redistribuição de organelas citoplasmáticas; (2) dinâmica dos filamentos citoesqueléticos; e (3) maturação molecular (Ferreira *et al.*, 2009).

Na fase de crescimento, o oócito sintetiza e estoca ácidos ribonucléicos mensageiros (RNAm) e proteínas de origem materna, necessárias para o desenvolvimento adequado das primeiras fases embrionárias. Essa reserva de material desempenha papel importante nos momentos críticos do desenvolvimento embrionário, como durante a ativação do genoma (estádio de 8-16 células) e a transição do estágio de mórula para blastocisto (Trimarchi *et al.*, 2000).

A ativação de determinadas vias metabólicas envolvidas na síntese e fosforilação de proteínas é indispensável para a maturação citoplasmática. Dentro desse contexto, as mitocôndrias desempenham papel importante para o metabolismo energético que é consumido durante o processo

de maturação. Elas sintetizam o ATP necessário para a síntese de proteínas (Stojkovic *et al.*, 2001). O movimento de mitocôndrias para áreas de alto consumo de energia é fundamental para os oócitos e embriões durante períodos críticos do ciclo celular (Ferreira *et al.*, 2009).

Análise estrutural de oócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro* identificou que as mitocôndrias, até então distribuídas homoganeamente, migram da periferia para uma distribuição heterogênea e dispersa em todo o citoplasma, após 12–18 h de cultura. Este evento é semelhante ao que ocorre *in vivo*. Antes do aumento de LH, a distribuição mitocondrial também é mais periférica (oócito imaturo) e, nos estádios finais do processo de maturação nuclear e após a extrusão do CP, aproximadamente 19 h após o aumento do LH, a distribuição torna-se heterogênea (Hyttel *et al.*, 1997).

Os grânulos corticais (GC) também são organelas exclusivamente encontradas no citoplasma de oócitos e, com o avanço da maturação, migram para sua periferia. Sua composição inclui diversas proteínas, moléculas estruturais, enzimas e glicosaminoglicanos. A exocitose de grânulos corticais (reação cortical) é um dos mecanismos para bloquear a poliespermia (Hosoe e Shioya, 1997). Esse bloqueio envolve liberação do conteúdo dos GC para o exterior, após a ativação do oócito, em resposta à entrada de espermatozoide no oolema, acarretando, assim, em modificação da ZP que proporcionará a barreira física e bioquímica para o gameta masculino (Haley e Wessel, 2004).

Durante o estágio de vesícula germinativa, o rearranjo espacial das organelas está relacionado com a modificação e organização do citoesqueleto (Albertini, 1992). A dinâmica dos filamentos do citoesqueleto está relacionada à aquisição de competência e maturação em oócitos bovinos (Albarracín *et al.*, 2005). Também, a maturação molecular corresponde às fases de crescimento e maturação de oócitos e envolve a transcrição, armazenamento e processamento dos RNAm expressa pelos cromossomos, que ainda serão traduzidos em proteínas pelos ribossomos. As proteínas derivadas desses RNAm estão envolvidas na maturação e nos eventos celulares subsequentes, tais como a fecundação, formação de pronúcleo e embrião precoce. Assim, essas proteínas são armazenadas até o tempo adequado para sua utilização (Sirard e Mayes, 2001).

## **2.6 Bloqueadores de Meiose**

Os ovários dos bovinos oferecem grande quantidade de oócitos que podem ser usados para a produção *in vitro* de embriões. Eles são submetidos aos processos de MIV, FIV e CIV. O desenvolvimento e a competência desses oócitos na produção de blastocistos ainda é baixa, em torno de 30 a 40%, em relação aos oócitos submetidos à MIV (Huang *et al.*, 2013).

O bloqueio da retomada da meiose, antes da maturação, foi sugerido como alternativa para permitir que os oócitos tenham tempo adicional na cultura, para que sofram modificações de pré-maturação (Adona *et al.*, 2008). Acredita-se que o prolongamento da parada meiótica *in vitro* e o bloqueio temporário da maturação nuclear espontânea podem melhorar a sincronização entre as maturações nuclear e citoplasmática (Ferreira *et al.*, 2009). Outra justificativa para utilizar bloqueadores meióticos é o transporte de oócitos por maiores períodos de tempo, normalmente quando as fêmeas doadoras se encontram em propriedades afastadas do laboratório de PIVE (Guemra *et al.*, 2014).

Os bloqueadores da meiose incluem os inibidores de fosfatases, inibidores da síntese protéica, da transcrição e tradução de RNAm. Alguns estudos têm utilizado butirrolactona I e a roscovitina, por exemplo, como substâncias inibidoras. A butirrolactona I é um potente e específico inibidor de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e demonstra bloquear o rompimento da vesícula germinativa, tendo poucos efeitos inibitórios sobre outras proteínas cinases como MAPK. Também, ela atua como fator competitivo inibidor de ATP. Já a roscovitina é uma purina conhecida por ser potente inibidor de ativação da quinase que forma o MPF (Kubelka *et al.*, 2000; Ponderato *et al.*, 2002).

## 2.7 Nanotecnologias

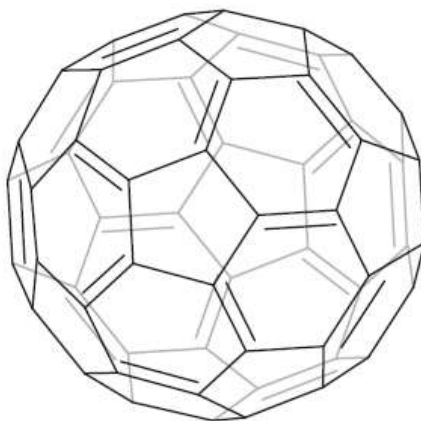
A nanotecnologia é um ramo da ciência que trabalha com a manipulação de produtos e processos em escala nanométrica, e requer técnicas e ferramentas exclusivas em diversas áreas de pesquisas. Um nanômetro (nm) equivale a um bilionésimo de um metro e, ainda assim, consegue ser maior que a escala atômica (Ladeira, 2013).

Nos últimos anos essa tecnologia vem sendo muito utilizada em todo o mundo, uma vez que esses materiais apresentam várias propriedades, tais como a grande área de superfície e suas propriedades físicas, viabilizando ainda mais sua aplicação. Dentre as nanoestruturas existentes, os nanotubos de carbono e os derivados de fulerenos se destacam nas áreas biológicas (Bosi *et al.*, 2003; Ladeira, 2013).

## 2.8 Fulerol, a nanopartícula de fulereno polihidroxilado

Com o intuito de estudar os mecanismos pelos quais as moléculas de carbono de cadeia longa se formavam no espaço, raios laser foram incididos no grafite para torná-lo vapor. Sendo assim, foi produzido *clusters* estáveis com 60 átomos de carbono (C<sub>60</sub>). Estes foram denominados, primeiramente, de “*buckminsterfulereno*” em homenagem ao norte-americano Richard Buckminster

Fuller, um designer, arquiteto, inventor e escritor, e que foi um célebre visionário pelos seus trabalhos dotados de cúpulas geodésicas (Kroto *et al.*, 1985). Posteriormente denominados de fulerenos, eles são uma família de nanomoléculas estáveis formadas exclusivamente por átomos de carbono. Alguns já foram isolados, mas o  $C_{60}$  é o mais abundante e forma estrutura oca e esféricas com diâmetros em escala nanométrica, tal como ilustrado na figura 3 (Santos *et al.*, 2010).



**Figura 3.** Estrutura da molécula de fulereno  $C_{60}$ , com 60 átomos de carbono formando um polígono de 60 vértices e 32 faces, 12 pentagonais e 20 hexagonais (Adaptado de Lichota e Krokosz, 2016).

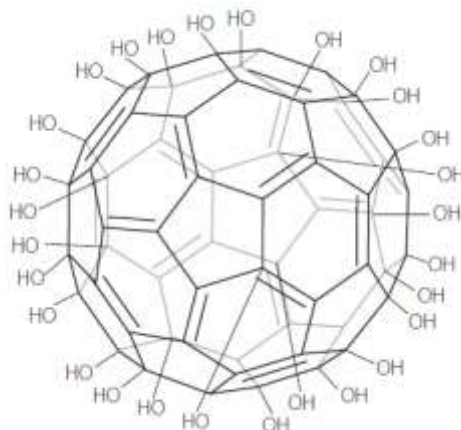
Os fulerenos leves, como  $C_{60}$  e  $C_{70}$ , podem ser aplicados em vários campos, incluindo mecânica, ciência de materiais, engenharia mecânica, construção, eletrônica, óptica, alimentos e cosméticos, farmacologia e medicina (Semenov *et al.*, 2016). Porém, devido sua baixa solubilidade em solventes usuais e insolúvel em solventes polares, sua aplicação prática, incluindo a área biológica, ainda é limitada (Santos *et al.*, 2010).

Várias funções biológicas foram encontradas para os derivados do fulereno, tais como suas propriedades antivirais e antibacterianas, antioxidantes e atividades neuroprotetoras, de sinalização celular e apoptose. Alguns compostos mostraram potencial para se desenvolverem como drogas anticâncer e agentes de diagnóstico (Bosi *et al.*, 2003).

As atividades biológicas dos fulerenos são consideravelmente influenciadas por suas modificações químicas e tratamento de luz (Rancan *et al.*, 2002). Geralmente, os fulerenos podem exibir alta atividade antioxidante em concentrações mais baixas, mas eles também são capazes de iniciar o processo de peroxidação lipídica e aumentar a permeabilidade iônica das biomembranas, especialmente após o tratamento com luz (Pickering e Wiesner, 2005).

Uma das técnicas usadas para funcionalização do fulereno é a polihidroxilação, que permite ligar na superfície do fulereno cerca de 22 a 24 hidroxilas ( $OH^-$ ), como mostra a figura 4. Esse

processo torna a molécula hidrossolúvel sem alterar suas propriedades originais, e essa nova estrutura passa a se chamar fulerol ou fulereno polihidroxilado (Dordevic e Bogdanovic, 2008).



**Figura 4.** Estrutura do fulereno polihidroxilado ou fulerol ( $C_{60}OH_{22-24}$ ) (Adaptado de Lichota e Krokosz, 2016).

O fulerol vem sendo usado em trabalhos e pesquisas no ramo da biologia, dentre eles pode-se citar: a) Schopf e colaboradores (2018) usaram o fulerol com diferentes radiofármacos, via simulação computacional. O sistema mostrou estável e pode ser usado para aplicações em sistemas biológicos, principalmente como possível biomarcador protéico para o diagnóstico da doença de Alzheimer; b) Ramos e colaboradores (2014) usaram o fulerol no tratamento de leishmaniose, nas formas livres e encapsuladas em lipossomas, assim como avaliaram seu efeito hepatoprotetor na quimioterapia. Esses autores concluíram que o fulerol pode ser usado como nova substância antileishmania, com grande potencial farmacológico na terapia da leishmania visceral e, também, com função hepatoprotetora; c) Ladeira e colaboradores (2013) fizeram a avaliação do seu efeito nas disfunções cardiovasculares provocadas por estresse oxidativo. Eles observaram que o fulerol, por meio de sua função antioxidante, pode prevenir danos causados pelo estresse oxidativo no sistema cardiovascular, e sua utilização com outro fármaco nos tratamentos melhoraram a função cardíaca; Lei e colaboradores (2018) usaram o fulerol na maturação *in vitro* de CCOs de ratos, visando investigar seu efeito na primeira retomada da meiose oocitária. Com esse estudo eles concluíram que o fulereno polihidroxilado interferiu no processo de retomada da meiose, causaram efeito que diminuiu os níveis de AMPc no oócito e, portanto, aceleraram a retomada da meiose em oócitos de ratos.

Os objetivos da presente dissertação foram avaliar, *in vitro*, a dinâmica da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos após a remoção do ambiente folicular e, também, diante de diversos estudos utilizando o fulerol, buscou-se avaliar sua ação em oócitos bovinos, quando adicionado ao meio de maturação *in vitro*.

### 3. Material e Métodos

O estudo foi realizado no Laboratório de Produção *in vitro* de Embriões do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG, em Belo Horizonte/MG no período de outubro de 2019 a março de 2020. Todos os procedimentos adotados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo nº 308/2018).

Todos os reagentes utilizados no trabalho foram adquiridos da Sigma<sup>®</sup> Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), exceto quando especificado na metodologia.

#### 3.1 Síntese laboratorial do fulerol

A síntese do fulerol (C<sub>60</sub>OH<sub>22-24</sub>) ocorreu a partir da funcionalização química do fulereno (C<sub>60</sub>), pelo processo de polihidroxilação, que foi realizada no Laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais, mesma metodologia utilizada no trabalho de Prata, 2019. O fulereno foi solubilizado em solução de tolueno (108mg/120mL) e, em seguida, solução de NaOH (200mM) aquecida à 50°C + hidróxido de tetrabutilamonio (TBAH) foi acrescentada lentamente, sob agitação magnética por três horas. Após esse processo foi obtida solução bifásica com sobrenadante cristalino contendo tolueno, e um precipitado amarronzado. O sobrenadante foi removido e o precipitado transferido para um retroevaporador com o objetivo de evaporar resíduos de solvente ainda presentes. Por fim, foram adicionados 50mL de água destilada aos fulerenos funcionalizados, e a solução foi filtrada com filtro Buckner a fim de remover resíduos de fulerenos C<sub>60</sub>. Para a correção do pH que alcança valores normais de até 14, devido a solução de NaOH, 500mL de metanol foram adicionados e, posteriormente, a solução foi filtrada até a obtenção de pH 7 na solução dos fulerenos. Após a síntese, a solução ficou acondicionada em estufa a 60°C, por 6 horas, dando origem a um pó escuro composto por fulerois de alta pureza.

#### 3.2 Diluição do fulerol e confecção dos meios de maturação

Para obter a solução na concentração proposta (50nM) para ser usada em um dos grupos experimentais do presente estudo, o fulerol de alta pureza, obtido no Laboratório de Nanomateriais da UFMG, foi submetido a diluições seriadas em solução *Phosphate buffered saline* (PBS) (D1408 Sigma). Na confecção da “solução mãe” (fonte de todas as diluições), 1,8mg de um pó constituído de fulerois foi diluído em 1mL de PBS, na concentração de 1800µg/mL. Posteriormente, 111µL da “solução mãe” foram adicionados a 199,889mL de PBS, obtendo-se assim a solução estoque, na

concentração de 1000µg/L. Essa solução foi dividida em alíquotas de 150µL e acondicionada em microtubos armazenados em geladeira a 4°C.

Para se obter o meio de maturação suplementado com 50nM de fulerol, 100µL da solução estoque foram adicionados a 1,9mL do meio de maturação *in vitro* (MIV padrão), utilizado no grupo controle (TC), que serão detalhados posteriormente.

### **3.3 Obtenção de complexos *cumulus-oophorus* (CCOs)**

Os ovários foram coletados logo após a evisceração dos animais em abatedouros da região metropolitana de Belo Horizonte, com habilitação de Serviço de Inspeção Federal. Os ovários foram transportados até o laboratório em solução fisiológica (0,9% NaCl) aquecida entre 30 e 35°C, não ultrapassando intervalo de quatro horas após o abate dos animais.

No laboratório, os ovários foram lavados em solução fisiológica (0,9% NaCl) aquecida a 36°C, e folículos com diâmetros de 3 a 8 mm foram aspirados utilizando-se agulhas (40 x 1,2mm) acopladas a seringas de 5mL. O fluido folicular aspirado foi transferido para tubos tipo Falcon de 50mL (TPP<sup>®</sup>, Suíça) até a marca de 30mL, mantidos em banho-maria à temperatura de 36°C durante, aproximadamente, dez minutos para sedimentação dos complexos *cumulus-oophorus*.

Após esse período, o precipitado foi transferido para placa de Petri (TPP<sup>®</sup>, Suíça) e nele adicionado o meio TCM-Hepes (Gibco<sup>®</sup> Life Technologies, Grand Island, EUA) para facilitar o rastreamento e classificação dos oócitos. A qualidade do citoplasma (homogeneidade, coloração e presença de granulações) e o número de camadas de células do *cumulus* foram avaliadas com auxílio de microscópio estereoscópico. Os COCs selecionados para maturação foram os de grau I e II, contendo mais de três camadas de células do *cumulus* e citoplasma uniforme, de acordo com a metodologia de Gonçalves *et al.* (2008). Em seguida, os COCs foram lavados duas vezes em meio TCM-199 Hepes (Gibco<sup>®</sup> Life Technologies, Grand Island, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco<sup>®</sup> Life Technologies, Grand Island, EUA), 83,4µg/mL de amicacina, e 22µg/mL de piruvato.

### **3.4 Maturação *in vitro* (MIV) dos complexos *cumulus oophorus***

Após as lavagens iniciais dos COCs em meio TCM-199 Hepes suplementado (Gibco<sup>®</sup> Life Technologies, Grand Island, EUA), os complexos foram novamente lavados no meio de maturação e submetidos à MIV.



No tratamento controle (TC) a MIV foi realizada em meio base de TCM-199 bicarbonato (Gibco® Life Technologies, Grand Island, EUA) acrescido de 10% de SFB, 0,5µg/mL de FSH (Folltropin-V®, Bioniche Inc., Canadá), 5g/mL de LH (Lutropin-V®, Bioniche Inc., Canadá), 10µg/mL de estradiol, 22µg/mL de piruvato e 83,4µg/mL de amicacina. Ao tratamento de maturação com Fulerol 50nM (MF50) foram adicionados ao meio de MIV 50nM de fulerol (TCM 199 Bicarbonato + 50nM fulerol). Essa dose foi proposta com base no estudo prévio da mesma equipe (Prata, 2019), quando foram testadas várias concentrações de fulerol adicionadas ao meio de maturação, sendo que a dose de 50nM proporcionou melhor resultado na PIVE, semelhante aos obtidos no tratamento controle daquele estudo.

A maturação dos COCs foi avaliada durante 36 horas, em gotas de 70µL de meio de maturação sob óleo mineral mantidas em placas de Petri de 60x16mm (TPP®, Suíça), que foram incubadas em estufa (Thermo Scientific®) à 38,5°C, com 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e 95% de umidade.

Foram realizadas nove rotinas laboratoriais para avaliação da maturação nuclear (n=6) e citoplasmática (n=3), de acordo com os seguintes tratamentos:

- Tratamento Controle (TC): meio de maturação TCM 199 Bicarbonato (n=300 para avaliação da maturação nuclear; n=197 para avaliação da maturação citoplasmática).

- Tratamento de Maturação com Fulerol 50nM (MF50): meio de maturação TCM 199 Bicarbonato + Fulerol 50nM (n=270 para avaliação da maturação nuclear; n=159 para avaliação da maturação citoplasmática).

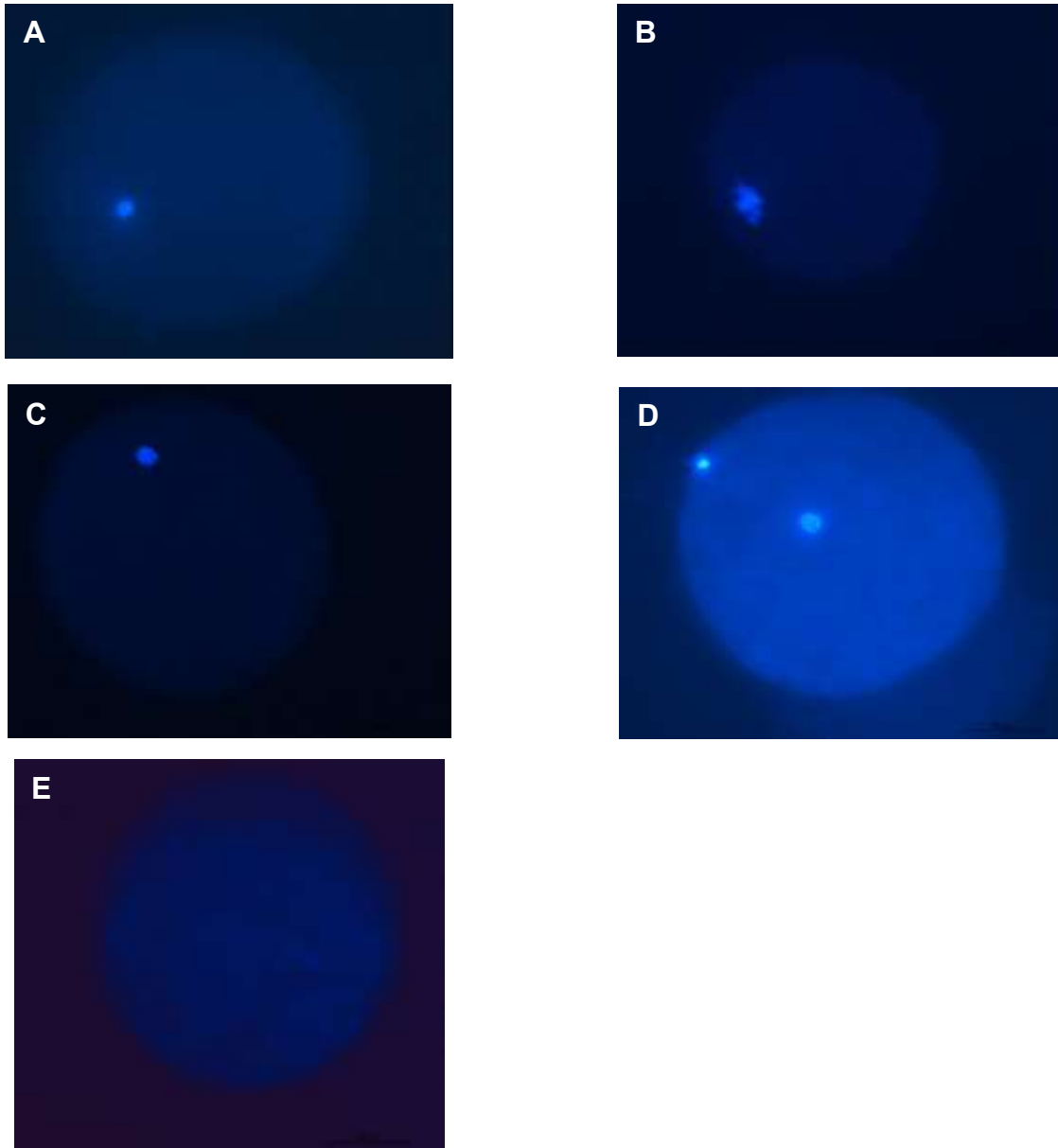
### **3.5 Avaliação da maturação nuclear dos oócitos**

Durante 36 horas após a seleção dos COCs graus I e II, a cada 6 horas, incluindo a 0 hora, um grupo de CCOs de cada tratamento (TC e MF50) foi retirado da MIV para avaliação do desenvolvimento da maturação nuclear. Para isso os COCs foram lavados duas vezes em DPBS + 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) para remover o meio de maturação e, em seguida, incubados em solução de hialuronidase (2mg/mL) a 38,5°C por cinco minutos, e desnudados por meio de sucessivas pipetagens. Posteriormente, esses oócitos desnudos foram fixados em paraformaldeído 4%, incubados por dez minutos em solução de Hoechst 33342 (1µL/mL em PBS) e, então, lavados três vezes em PBS, transferidos para lâmina, e cobertos por uma gota de glicerol e lamínula, respectivamente. Após três a cinco dias da fixação foi avaliada a maturação nuclear dos oócitos por meio de microscópio de fluorescência (filtro azul 460nm; aumento 400X).

Os oócitos, baseado na metodologia de Hewitt e England (1997), foram classificados quanto aos estádios de maturação em:

- Vesícula germinativa (VG): núcleo vesicular e cromossomos pouco ou não condensados;
- Quebra da vesícula germinativa (QVG): reinício da meiose com algum grau de descondensação da cromatina e desaparecimento da vesícula nuclear;
- Metáfase I (MI): cromossomos com alto grau de condensação;
- Metáfase II (MII): cromossomos condensados e extrusão do primeiro corpúsculo polar.
- Oócitos degenerados (DEG): oócitos retraídos e com ausência de cromossomos no citoplasma.

As imagens da figura 5 representam os diferentes estádios da maturação nuclear avaliados.



**Figura 5.** Fotomicrografias obtidas em microscópio de fluorescência das diversas fases da maturação nuclear de oócitos bovinos corados com Hoechst 33342. (A) Oócito em vesícula germinativa (VG - Prófase I da meiose): cromossomos descondensados; (B) Quebra da vesícula germinativa (QVG); (C) Oócito em metáfase I: cromossomos altamente condensados; (D) Oócito em metáfase II: cromossomos condensados na placa metafásica e extrusão do primeiro corpúsculo polar (E) Oócito degenerado: retração oocitária e ausência de núcleo (Aumento de 400x).

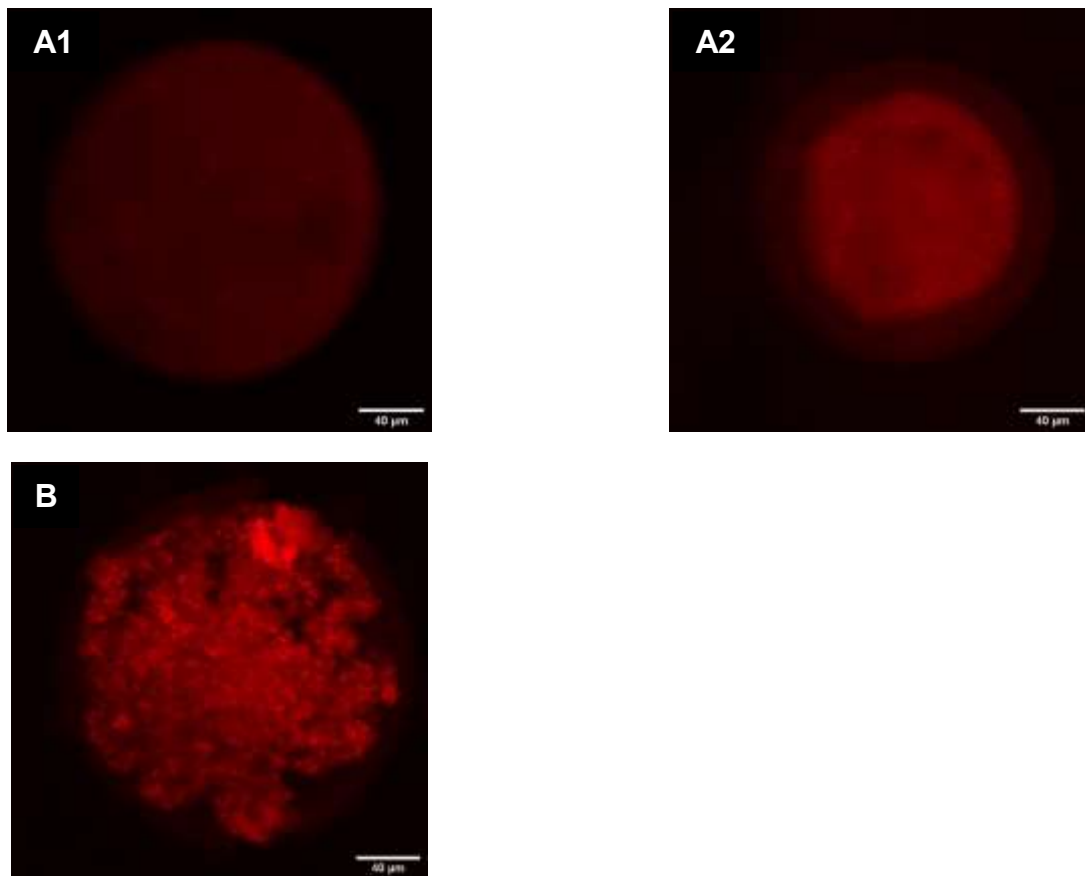
### 3.6 Avaliação da maturação citoplasmática dos oócitos

A avaliação da maturação citoplasmática foi realizada com a coloração Mitotracker Orange (Life® Technologies, Carlsbad, CA, USA), de acordo com a metodologia proposta por Jeseta *et al.* (2014). A partir da 0 hora, e a cada 12 horas (até 36 horas) de maturação, um grupo de oócitos de cada tratamento (TC e MF50) foi submetido à coloração. Os oócitos foram lavados três vezes em DPBS + 0,4% BSA e incubados por 30 minutos à 38,5°C, a 5% CO<sub>2</sub> com *Dulbecco Phosphate Buffered Saline* (DPBS) suplementado com 4mg/mL de BSA e 280nM de *Mitotracker Orange*. Logo após, foram novamente lavados e colocados durante cinco minutos em solução de hialuronidase, para desnudamento das células do *cumulus oophorus*. Em seguida, foram lavados em PBS + 0,5% de álcool polivinílico (PVP) e fixados em paraformaldeído à 4%.

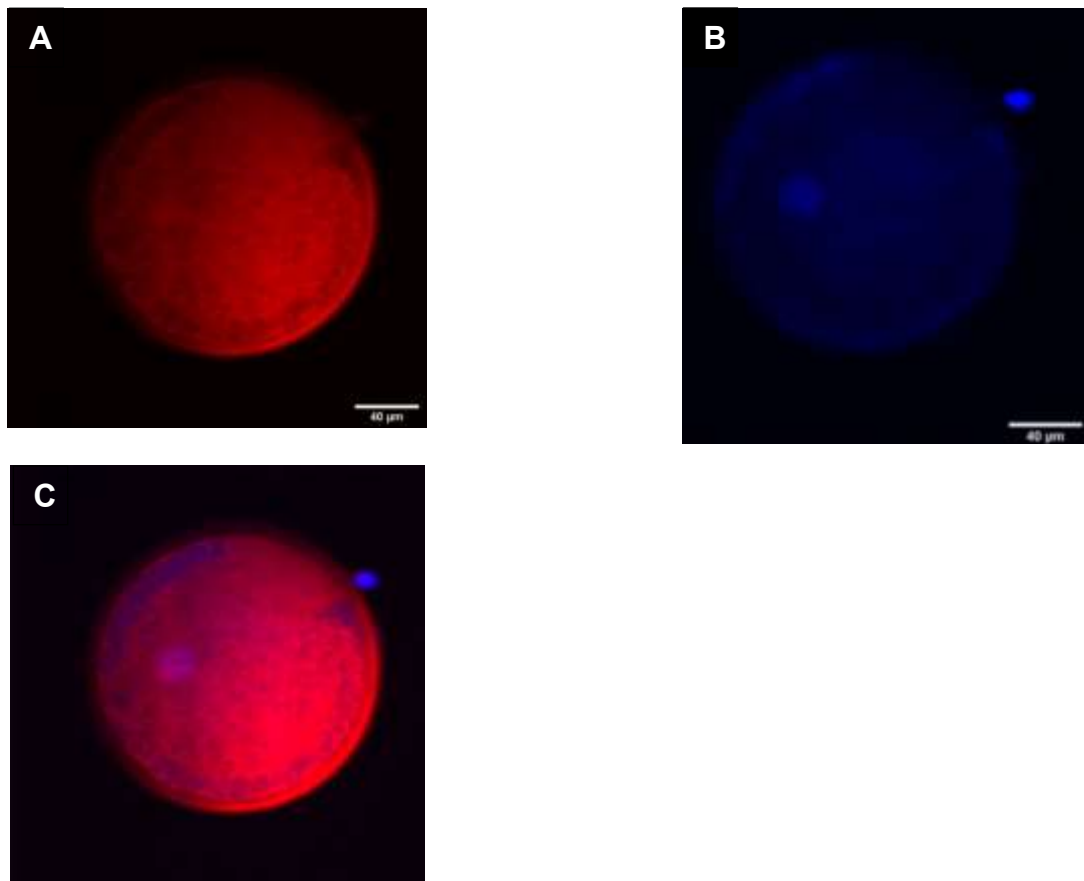
Para confecção das lâminas, os oócitos foram lavados mais uma vez em PBS + 0,5% de PVP e, no máximo, cinco oócitos foram transferidos para a lâmina, devidamente identificada quanto ao tratamento, horário e rotina laboratorial. Em seguida, cada gota contendo oócitos foi coberta por uma gota de solução glicerol + Hoechst + lamínula. Após quatro dias da confecção das lâminas, a emissão de fluorescência mitocondrial dos oócitos foi avaliada em microscópio confocal Zeiss LSM 5 Live (Carl Zeiss®, Jena, Thuringia, Germany - onda emissão de 543nm e onda de excitação de 585 a 649nm) pertencente ao Centro de Aquisição e Processamento de Imagens – CAPI, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

A maturação dos oócitos foi avaliada de acordo com a distribuição das mitocôndrias no citoplasma da célula, sendo homogênea e periférica em oócitos imaturos e heterogênea nos maturados, segundo o padrão adotado por Katska-Ksiazkiewicz *et al.* (2011). As imagens da figura 6 representa os diferentes estádios da maturação citoplasmática avaliados.

Foram avaliados 197 e 159 oócitos para os tratamentos Controle e Fulerol 50nM, respectivamente, de acordo com a maturação citoplasmática, sendo que os oócitos foram distribuídos nos tempos de 0, 12, 24 e 36 horas. Desses oócitos, 109 do TC e 100 do MF50 foram avaliados conjuntamente a maturação nuclear e citoplasmática, nos tempos citados anteriormente. A avaliação dos oócitos quanto as maturações citoplasmáticas e nucleares foram feitas conjuntamente nos mesmos oócitos. Foi considerado maturado o oócito com distribuição mitocondrial heterogênea e cromossomos condensados, com extrusão do corpúsculo polar (Figura 7).



**Figura 6.** Imagens de microscopia do plano equatorial dos oócitos bovinos mostrando o padrão de distribuição citoplasmática das mitocôndrias marcadas com o MitoTracker Orange. (A) Oócitos imaturos com padrão homogêneo (A1) e distribuição periférica de mitocôndrias (A2); (B) Padrão heterogêneo em oócitos maturados. (Aumento de 400x).



**Figura 7.** Oócitos bovinos. Fotomicrografia representativa da microscopia de fluorescência demonstrando oócitos na fase de Metáfase II. (A) Padrão de distribuição das mitocôndrias no interior do ooplasma (heterogêneo) coradas com Mitotracker Orange; (B) Marcação da cromatina com Hoechst 33342, diferenciando os cromossomos condensados e a extrusão do corpúsculo polar (C) Sobreposição das imagens (Aumento de 400x).

### 3.7 Análises Estatísticas

O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado. O percentual de maturação nuclear e citoplasmática *in vitro* dos oócitos, ao longo das horas de incubação, foi reportada de modo descritivo. A comparação entre tratamentos, Controle e Fulerol 50nM, das taxas de maturação nuclear e citoplasmática, dentro de cada hora, foi avaliada pelo teste Exato de Fisher, utilizando-se o programa estatístico *GraphPad Instat* versão 3.06.

## 4. Resultados e Discussão















### 4.1 Características dos oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio controle ou suplementado de fulerol 50nM

A figura 8 possui imagens dos oócitos nas placas de maturação *in vitro*, em função das horas de cultivo. Verifica-se que com o decorrer das horas ocorre a expansão das células do *cumulus oophorus*, que é uma característica da maturação oocitária. Macroscopicamente existe diferença entre os oócitos provenientes dos tratamentos controle e fulerol 50nM. Nesse último parece que, mesmo em processo de expansão, as células possuem maior agregação e contato, que pode ser explicada pelo aspecto mais gelatinoso (observação visual das placas de cultivo durante o experimento) nos oócitos maturados em meio MIV suplementado com fulerol 50nM.

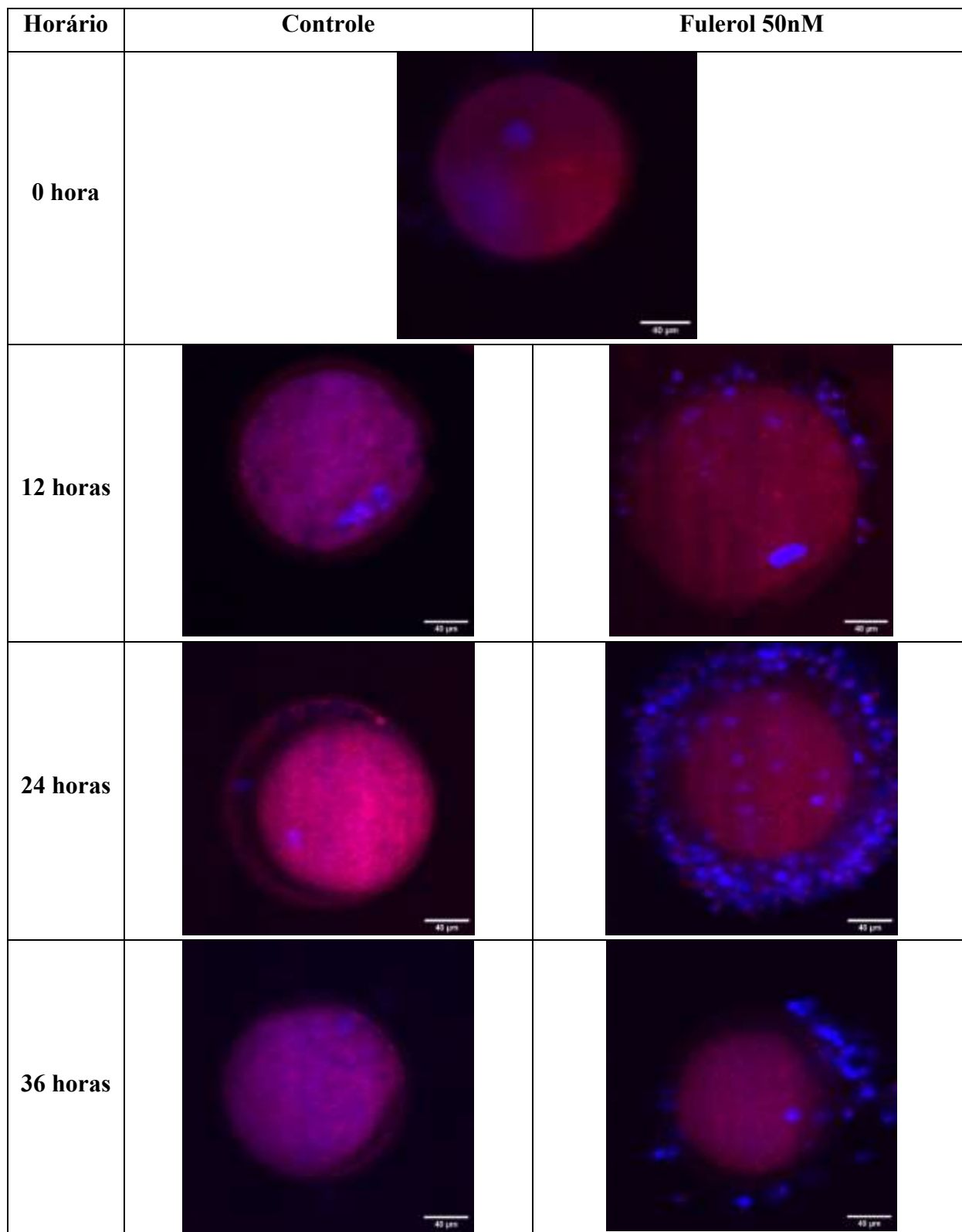
*In vivo*, à medida que o oócito matura em resposta à onda pré-ovulatória de LH, as células do *cumulus* secretam um glicosaminoglicano não sulfatado, o ácido hialurônico, que é mantido ligado às células por meio de proteínas de ligação. Com a hidratação do ácido hialurônico, os espaços entre as células do *cumulus* aumentam e as células ficam em uma matriz gelatinosa e mucificada, característico da expansão das células do *cumulus*. Além disso, a expansão do *cumulus* também depende de fatores de capacitação da expansão do *cumulus* (CEEFs) produzidos pelo oócito (Dragovic *et al.*, 2005).

Outra observação verificada durante as rotinas laboratoriais do presente estudo foi a maior dificuldade em desnudar os oócitos do tratamento suplementado com fulerol 50nM, que é realizado por sucessivas pipetagens, assim como realizado no grupo controle. Após coloração com *Mitotracker Orange*, verificou-se que os oócitos do tratamento MF50 ainda apresentavam maior número de células do *cumulus oophorus* aderidas à superfície do oócito, quando comparados aos oócitos do grupo controle (Figura 9).

As células do *cumulus oophorus* são importantes para o crescimento e desenvolvimento do oócito (Li *et al.*, 2000) e, durante o período pré-ovulatório, elas sintetizam e depositam matriz intercelular enriquecida de ácido hialurônico que leva à expansão (mucificação) do COCs (Salustri *et al.*, 1990). Os COCs de boa qualidade possuem várias camadas de células do *cumulus* que possuem cisternas bem desenvolvidas de retículo endoplasmático rugoso e complexos de Golgi. As células adjacentes à zona pelúcida possuem numerosas projeções que a penetraram e terminam em invaginações no oolema. Junções com morfologia semelhante às junções *gap* são observadas entre essas projeções. Concomitantemente com a quebra da vesícula germinativa, essas junções são desfeitas (Hyttel *et al.*, 1986).

Horário	Controle	Fulerol 50nM
0 hora		
6 horas		
12 horas		
18 horas		
24 horas		
30 horas		
36 horas		

**Figura 8.** Oócitos bovinos durante as horas da maturação *in vitro* (aumento 40X), em função dos tratamentos controle e suplementado com fulerol 50nM.



**Figura 9.** Oócitos bovinos corados por *Mitotracker Orange* e Hoechst durante as horas da maturação *in vitro* (aumento 400X), para os grupos Controle e Fulerol 50nM.

Possivelmente, a observação reportada no presente estudo, de dificuldade para o desnudamento dos oócitos do grupo fulerol 50nM, sugere que o fulerol possa agir, também, nas células do *cumulus* de tal forma a mantê-las com maior aderência.



#### 4.2 Maturação nuclear de oócitos cultivados em meio MIV convencional ou suplementado com fulerol 50nM

A Tabela 1 contém, de forma descritiva, os percentuais de maturação nuclear ao longo das horas de cultivo *in vitro*, de oócitos dos tratamentos controle e suplementado com 50nM de fulerol.

**Tabela 1.** Percentual das diferentes configurações cromossômicas (maturação nuclear) de oócitos bovinos cultivados *in vitro* em condições convencionais (TC; n=300) ou suplementados com fulerol 50nM (MF50; n=270).

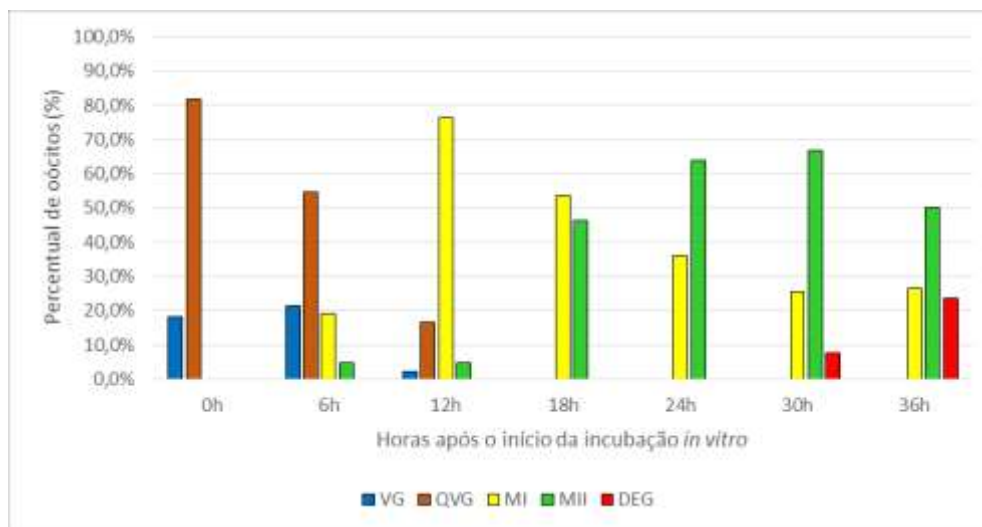
Tempo (horas)	Grupo Controle (TC)					Fulerol 50nM (MF50)				
	VG	QVG	MI	MII	DEG	VG	QVG	MI	MII	DEG
0	18,2%	81,8%	0,0%	0,0%	0,0%	17,4%	82,6%	0,0%	0,0%	0,0%
6	21,4%	54,8%	19,0%	4,8%	0,0%	42,9%	57,1%	0,0%	0,0%	0,0%
12	2,4%	16,7%	76,2%	4,8%	0,0%	23,5%	76,5%	0,0%	0,0%	0,0%
18	0,0%	0,0%	53,7%	46,3%	0,0%	36,7%	40,0%	3,3%	20,0%	0,0%
24	0,0%	0,0%	36,2%	63,8%	0,0%	14,6%	12,2%	29,3%	43,9%	0,0%
30	0,0%	0,0%	25,6%	66,7%	7,7%	5,0%	20,0%	35,0%	37,5%	2,5%
36	0,0%	0,0%	26,5%	50,0%	23,5%	15,1%	15,1%	20,8%	41,5%	7,5%

VG (Vesícula germinativa); QVG (Quebra da vesícula germinativa); MI (Metáfase I); MII (Metáfase II); DEG = degenerados.

Verifica-se que na hora zero (0), após chegada ao laboratório e seleção, os oócitos ainda não submetidos aos tratamentos estavam, em sua maioria (81,8 e 82,6% para os tratamentos controle e fulerol 50nM, respectivamente) no estágio de QVG, porém, sem oócitos nos estádios de MI, MII e degenerados. Após 6 horas de incubação, no tratamento controle, verificou-se oócitos (19,0%) em MI e início de MII (4,8%), que foram progredindo a maturação ao longo das horas até que foi verificada, às 18 horas, proporcionalidade (53,7 e 46,3%) nas relações MI e MII, e não mais encontrando oócitos nas fases de VG e QVG. A degeneração dos oócitos foi verificada a partir de 30 horas, tanto no tratamento controle quanto fulerol 50nM, porém, numericamente superior no tratamento controle.

Ao contrário, para o tratamento MF50, verificou-se que os oócitos permaneceram nos estádios de VG e QVG por mais horas, reduzindo o percentual progressivamente, mas persistindo até as 36 horas de cultivo. A partir das 18 horas de maturação *in vitro* foram detectados oócitos nas fases de metáfase I e II. Também, para o tratamento MF50, oócitos degenerados foram verificados após 30 horas de cultivo, semelhante ao tratamento controle.

A demonstração da dinâmica temporal das diferentes fases da maturação *in vitro* dos oócitos bovinos do tratamento controle, maturados *in vitro* em condições normais, ausente de suplementação com fulerol, está ilustrada no gráfico 1.



**Gráfico 1.** Taxa de maturação *in vitro* de oócitos bovinos (n=300) do grupo controle, em relação às horas após o início da incubação. VG = vesícula germinativa, QVG = quebra da vesícula germinativa, MI = metáfase I, MII = metáfase II, DEG = degenerados.

No tratamento controle verificou-se padrão dos eventos que ocorrem na maturação nuclear dos oócitos semelhante a “ondas”, sendo elas: “onda” da quebra da vesícula germinativa, “onda” da metáfase I, “onda” da metáfase II, e início da “onda” da degeneração, cujos picos ocorreram às 0, 12, 30 e 36 horas, respectivamente. À 0 hora verifica-se que mais de 80% dos oócitos já se encontram em QVG, evidenciando que a partir do abate das fêmeas os ovários perdem o suprimento sanguíneo e hormonal que fornece às células foliculares substâncias controladoras da maturação, promovendo o desbloqueio meiótico e quebra da vesícula germinativa.

O ponto de máximo de cada *onda* de estádios da maturação nuclear, descritas no presente estudo, ocorreu a cada 12 horas, com 81,8%, 76,2% e 63,8%, respectivamente para a 0, 12, 24 horas de incubação *in vitro*. Os oócitos degenerados iniciaram curva ascendente após 30 horas, com tendência de aumento posterior, porém o estudo se encerrou às 36 horas de cultivo.

Quando o complexo *cumulus oophorus* é removido do microambiente folicular, ele perde o contato com as células da granulosa com as quais estabelecia comunicações por meio de junções *gap* (Downs, 1995). A perda dessa barreira físico-química leva à perda da membrana nuclear, conhecida por vesícula germinativa, e ao início da condensação da cromatina, de forma que progrida a maturação nuclear, anteriormente bloqueada em prófase I da meiose para a metáfase II (Edwards, 1965).

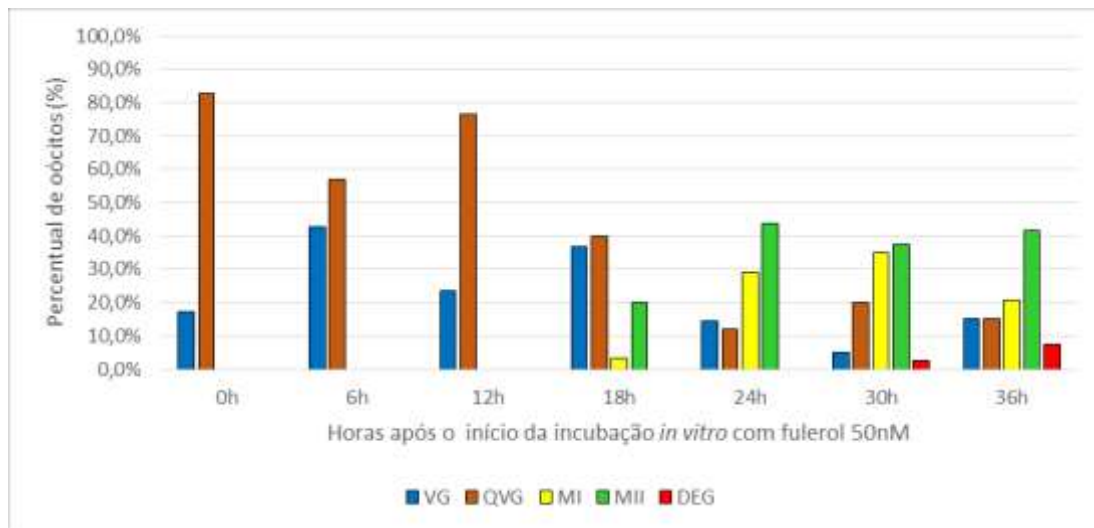
Semelhante ao que ocorre após aspiração folicular *in vivo*, a retirada dos oócitos do microambiente folicular e o cultivo em meio de maturação leva à cessação da difusão de moléculas controladoras da retomada da meiose produzidas pelas células foliculares, possibilitando a progressão da divisão meiótica, com a quebra da vesícula germinativa (Pincus e Enzmann, 1935). *In vivo*, a maturação nuclear normalmente é induzida pelo pico de LH e, portanto, envolve a quebra da comunicação oócito-células foliculares, levando à perda de contato com substâncias produzidas pelas células da granulosa, o fator inibidor da meiose e o AMPc e, com isso, a redução da concentração intra-oocitária que resulta na saída do bloqueio meiótico. A redução do AMPc induz a desfosforilação e ativação do MPF (Nogueira *et al.*, 2003). Também foi sugerido que a expressão de fosfodiesterase controla a concentração de AMPc e, conseqüentemente, a maturação nuclear (Tsafiri *et al.*, 1996).

No estudo realizado por Hyttel *et al.* (1986), oócitos aspirados de ovários de matadouros foram incubados por 48 horas, e parte fixados às 3, 6, 9, 12, 18, 21, 24, 30, 40 e 48 horas. Foi verificado que a QVG ocorreu após 3 horas até 12 horas de cultura. Aproximadamente às 12 horas também ocorreu a expansão parcial das células do *cumulus oophorus* de alguns COCs e, às 18 horas, todos os oócitos estavam completamente expandidos. No período de 18 a 21 horas de incubação foram verificados os primeiros corpúsculos polares e, entre 40 e 48 horas, os CP não mais foram vistos ou foram considerados degenerados.

Edwards *et al.* (2005) estudaram a maturação em oócitos cultivados a 38,5°C (grupo controle) ou a 41°C (choque térmico), por 24 horas. A análise de pequeno grupo de oócitos, antes da cultura, indicaram que todos estavam no estágio de VG. Considerando o grupo controle como referência, quatro horas após a MIV os oócitos estavam com VG intacta ou em QVG. Às 12 horas, a maioria já se encontrava em MI e a progressão para a metáfase II ocorreu nos intervalos subsequentes de 16, 18 e 21 horas de maturação. A maioria da MII foi encontrada às 21 horas do início da maturação *in vitro*.

Os achados desses autores corroboram com o que foi verificado no presente estudo, ou seja, coincidiu os períodos de incubação dos oócitos com as fases de maturação em que se encontravam. A observação que à 0 hora a maioria dos oócitos estavam no estágio de QVG pode ser explicada segundo o estudo de Hyttel *et al.* (1986), fez análise a partir do período de 3 horas. Logo, pode-se explicar que os gametas estavam nesta fase desde o início. Já, Edwards *et al.* (2005) verificaram que à 0 hora todos os oócitos em VG, o que pode ser explicado pelo tempo dispendido para coleta dos ovários, aspiração, rastreamento e avaliação da maturação dos oócitos desse presente estudo, que se encontravam em QVG já na 0 hora.

No gráfico 2 está representada a dinâmica temporal das diferentes fases da maturação *in vitro* de oócitos bovinos submetidos ao tratamento suplementado com 50nM de fulerol durante 36 horas.



**Gráfico 2.** Taxa de maturação *in vitro* de oócitos bovinos (n=270), em relação às horas após o início da incubação em meio contendo 50nM de Fulerol. VG = vesícula germinativa, QVG = quebra da vesícula germinativa, MI = metáfase I, MII = metáfase II, DEG = degenerados.

Diferentemente do tratamento controle em que foi verificado padrão dos eventos de maturação nuclear dos oócitos semelhante a “ondas”, com maiores percentuais de oócitos em VG e QVG no período de 12 horas, no tratamento com fulerol 50nM pôde-se observar tempo prolongado de retenção da maturação nuclear. Isso pode ser demonstrado pela presença de oócitos retidos na VG e QVG durante o período experimental de 36 horas, com maior concentração até 18 horas, ou seja, 6 horas a mais em relação ao tratamento controle. Também, a progressão inicial para o estágio de metáfase I e II somente ocorreu a partir das 18 horas, quando comparado com 6 horas do tratamento controle. Esse resultado demonstra, possivelmente, que o fulerol pode estar atuando como bloqueador de meiose, efeito semelhante ao que ocorre com a butirolactona I, quando usada no cultivo de oócitos (Gottardi e Mingoti, 2009).

A butirolactona I, um metabólito fúngico (Schimmel *et al.*, 1998) que atua como inibidor seletivo de quinases dependentes de ciclina, promove o bloqueio da meiose por inibir tanto a CDK1 quanto a CDC2 quinase. Este composto inibe a quebra da vesícula germinativa, porém, os oócitos continuam sintetizando RNAr, e a síntese diminui apenas quando há compactação da cromatina (Marques *et al.*, 2011). Estudos tem verificado que o impedimento da retomada da meiose, antes da maturação *in vitro*, possibilitaria incremento na competência de desenvolvimento posterior. Por conseguinte, para impedir o reinício voluntário da divisão meiótica é preciso manter altas concentrações intra-oocitárias de AMPc (Conti *et al.*, 2012) e, nesse caso, a utilização farmacológica da butirolactona I.

O bloqueio da meiose em oócitos dependente da fosforilação catalisada pela PKA, dependente de AMPc, que faz parte da via de transdução de sinal que inclui as enzimas adenilato ciclase e

fosfodiesterase. O AMPc produzido se liga à subunidade reguladora da PKA, que pode ser de tipo I ou II (Mochly-Rosen, 1995). A subunidade II está localizada nas células do *cumulus*, e é encontrada próxima a substratos protéicos que são rapidamente fosforilados em resposta ao aumento da concentração intracelular de AMPc, induzindo à retomada da meiose. Ao contrário, quando ocorre a ativação da subunidade tipo I, presente no oócito, mantém a meiose inibida (Downs e Hunzicker-Dunn, 1995). Portanto, a alta concentração de AMPc nas células do *cumulus* leva à quebra da vesícula germinativa, enquanto a alta concentração de AMPc no oócito leva a ativação da PKA, que fosforila proteínas específicas do oócito que o mantém imaturo (Bilodeau–Goeseels *et al.*, 1993).

No gráfico 1 que representa o tratamento controle, o padrão de “ondas” esteve caracterizado por concentração de maiores percentuais dos diferentes estádios de maturação nuclear em determinados tempos de incubação *in vitro*, diferentemente do tratamento fulerol 50nM em que foi verificado dispersão temporal e atenuação dos pontos de máximo das “ondas” dos estádios da maturação nuclear, sempre inferiores a 50% para a metáfase I e II.

Semelhante ao tratameto controle, o percentual de degeneração dos oócitos iniciou às 30 horas de cultivo e aumenta nas próximas 6 horas. Contudo, numericamente, o percentual de degeneração foi inferior para o tratamento fulerol 50nM, sendo de 7,7% e 2,5% e 23,5% 7,5%, respectivamente para as 30 e 36 horas de cultivo *in vitro*.

Foi observado também que o fulerol reteve os oócitos em QVG no intervalo de 6 às 18 horas, uma vez que a partir desse período o percentual de oócitos em metáfase II é maior do que as outras fases. Com isso, supõe-se que após esse período o fulerol perde o efeito de bloqueador sob os oócitos podendo ter saturado suas ligações, sendo necessário *feeding* dessa substância às 18 horas de MIV ou aumente a sua concentração no meio.

Em trabalho realizado por Barretto e colaboradores (2007) analisaram a maturação nuclear em oócitos cultivados em meios convencional, suplementado com 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) e roscovitina (ROSC), sendo os dois últimos considerados agentes inibidores da retomada da meiose. A IBMX mantém os níveis de AMPc elevados e a ROSC inibe a atividade de MPF. À 0 hora 79,9% dos oócitos estavam em estágio de VG e 19,7% em MI, e esse padrão se manteve até as 8 horas em todos os tratamentos. Às 16 horas, a porcentagem de oócitos no estágio VG foi superior para o grupo suplementado com roscovitina (32,41%), em comparação aos grupos controle (8,61%) e IBMX (9,73%). Às 24 h de cultura, a progressão da meiose para MII foi retardada no grupo ROSC, onde 24,05% dos oócitos encontravam se nessa fase, em comparação com o controle (60,20%) e grupo IBMX (33,88%). O resultado desse estudo corrobora com o fato do fulerol se comportar como

bloqueador meiótico, pois até as 18 horas a quantidade de oócitos em QVG, ainda imaturos, se manteve superior aos outros estádios.

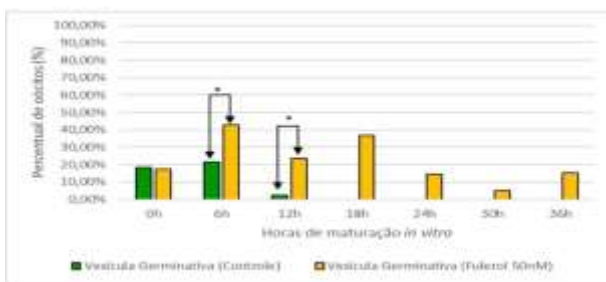
A retomada da meiose e sua progressão para MI depende da ativação do fator promotor da maturação pertencente à família das proteínas quinases (Gautier *et al.*, 1988). Estudos indicam que o AMPc inibe a ativação do fator promotor da maturação, por prevenir a sua desfosforilação e, também, suprime a síntese de ciclina B, diminuindo a quantidade disponível de pré-fator promotor da maturação (Josefsberg *et al.*, 2003). O fator promotor da maturação ativo fosforila as proteínas da membrana nuclear, fosforila as histonas que são responsáveis pela condensação da cromatina e, também, a reorganização do citoesqueleto (Verde *et al.*, 1992). O fator promotor da meiose atua na quebra da vesícula germinativa por meio da dissolução do nucléolo, condensação cromossômica, reorganização dos microtúbulos e dissolução da membrana nuclear. Após a QVG, ocorre progressão da meiose até a metáfase II quando, novamente, permanece bloqueada até que o oócito seja fecundado e, nos bovinos, a maturação nuclear do oócito ocorre em 24 horas (Sirard e First, 1988). Outra quinase envolvida na maturação oocitária é pertencente à família MAPKs (Pearson *et al.*, 2001). Os principais alvos destas enzimas são as proteínas do citoesqueleto, regulando a organização microtubular e da cromatina, embora também possuam outros alvos no citoplasma e núcleo (Verlhac *et al.*, 1993).

Prata (2019), ao avaliar a maturação nuclear em oócitos cultivados com 1, 10 e 50nM de fulerol, verificou que após 24 horas de MIV, o tratamento controle apresentou maior quantidade de gametas maduros (53,3%). Para os tratamentos com fulerol, esse autor verificou que o tratamento com 50nM de fulerol apresentou quantidade de oócitos maduros inferior aos demais tratamentos (33,3% dos oócitos em MII), e não diferiu entre os grupos de 1nM (48,2%) e 10nM (48,0%) de fulerol. Foi sugerido que, provavelmente, a adição do fulerol em maiores concentrações no meio de maturação atue como bloqueador da maturação nuclear *in vitro*.

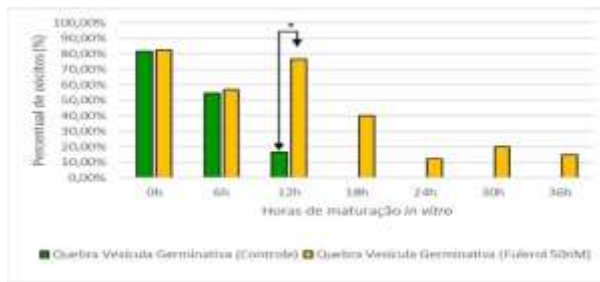
Diante dos resultados do presente estudo e do comportamento de outras substâncias inibidoras meióticas, sugere-se que o fulerol atue como bloqueador da meiose, supostamente por meio das MAPKs, enzimas que atuam nas proteínas do citoesqueleto, regulando a organização microtubular e, portanto, no fuso meiótico (Verlhac *et al.*, 1993; Pearson *et al.*, 2001).

Na Figura 10 estão representadas as comparações temporais dos diferentes estádios de maturação dos oócitos bovinos cultivados *in vitro* nos meios controle e suplementado com fulerol 50nM.

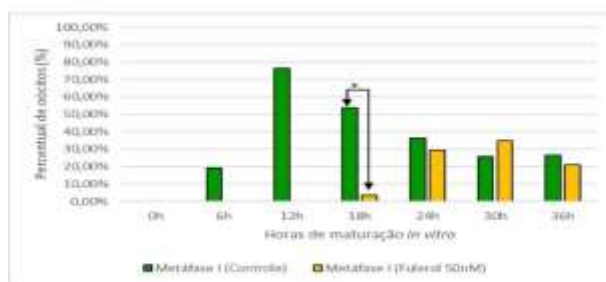
A)



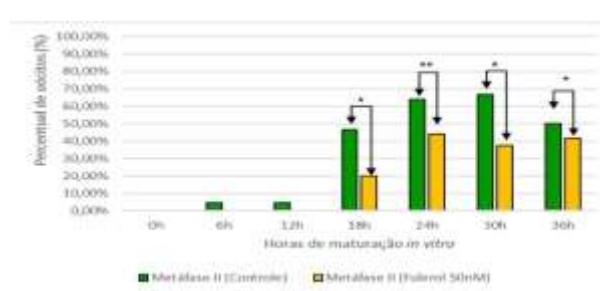
B)



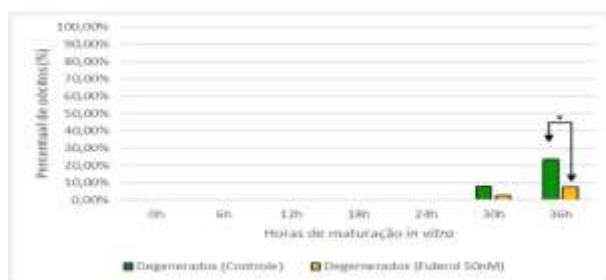
C)



D)



E)



**Figura 10.** Distribuição percentual dos diferentes estádios (A= vesícula germinativa; B= quebra da vesícula germinativa; C= metáfase I; D= metáfase II) da maturação nuclear e de degeneração oocitária (E) de oócitos bovinos cultivados *in vitro* em meio convencional ou contendo 50nM de Fulerol, em função das horas de incubação. Dados analisados pelo Teste Exato de Fisher (*GraphPad Instat 3.06*) a 5% de significância. \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P = 0,08$ .

A retenção dos oócitos no estágio de VG ( $P < 0,05$ ) é evidenciada às 6 e 12 horas (Figura 10A), e para QVG ( $P < 0,05$ ) às 12 horas (Figura 10B) para o tratamento fulerol 50nM, quando comparado com o tratamento controle, e não diferiram ( $P > 0,05$ ) para os demais horários de avaliação. Considerando as 12 horas de cultivo, o tratamento com fulerol 50nM manteve maiores taxas de oócitos em vesícula germinativa (23,5% vs 2,4%) e quebra da vesícula germinativa (76,5% vs 16,5%), respectivamente.

A progressão para metáfase I (Figura 10C) é vista tão precocemente quanto 6 horas de cultivo do tratamento controle, enquanto para o tratamento fulerol 50nM iniciou-se às 18 horas, ou seja, diferença de 12 horas após o início da incubação *in vitro*, o que sugere ser o fulerol um agente bloqueador da meiose. Às 12 horas de incubação, quando 76,2% de oócitos do tratamento controle estavam em metáfase I, nenhum oócito do tratamento fulerol 50nM havia retomado a divisão meiótica. Às 18 horas também ocorreu diferença estatística ( $P < 0,05$ ), quando 53,7% e 3,3% dos oócitos estavam em metáfase I, para o tratamento controle e fulerol 50nM, respectivamente.

A maturação nuclear (Figura 10D) iniciou às 18 horas de incubação para os dois tratamentos, e mantiveram diferença estatística até o tempo final do estudo. As diferenças percentuais foram superiores para o tratamento controle em 26,3% ( $P < 0,05$ ), 19,9% ( $P < 0,08$ ), 29,3% ( $P < 0,05$ ) e 11,5% ( $P < 0,05$ ) para as 18, 24, 30 e 36 horas de incubação, respectivamente. Esses resultados novamente sugerem o fulerol como agente bloqueador da meiose.

A degeneração dos oócitos, iniciadas às 30 horas de incubação *in vitro* para os dois tratamentos, diferiu ( $P < 0,05$ ) às 36 horas, quando o tratamento controle teve 16% (23,5% vs 7,5%) a mais de oócitos degenerados que o tratamento fulerol 50nM (Figura 10E).

Na MIV, quando os folículos são aspirados dos ovários, ocorre a retomada da divisão meiótica daqueles oócitos competentes e que atingiram diâmetro mínimo para a espécie. Acredita-se que essa aquisição de competência do oócito ocorre antes da retomada da meiose e, a retirada do mesmo do ambiente folicular, que possui fatores inibitórios que os mantem estacionados na divisão meiótica, proporciona a progressão da maturação (Sirard e Mayes, 2001). Após a retirada do oócito, ocorre retomada espontânea da meiose, independentemente de gonadotropinas, devido à ausência de fatores inibidores. Na maturação *in vitro*, a resolução da meiose ocorre, em média, em 24 horas. As elevadas concentrações intra-oocitárias de AMPc, que são acumuladas durante o crescimento folicular, estão associadas a oócitos com alta competência de fecundação (Luciano *et al.*, 1999). Ao contrário, em condições *in vivo*, após o pico pré-ovulatório de LH ou a remoção mecânica do oócito do folículo, as concentrações de AMPc reduzem gradativamente desbloqueando a meiose (Richard e Sirard, 1996).



Todavia, apenas a retomada do processo de maturação nuclear não é o suficiente para garantir o desenvolvimento embrionário posterior, sendo necessário que ocorra a maturação citoplasmática, que é uma etapa que necessita maior duração. Por isso, estudos com bloqueadores de meiose têm sido realizados para permitir a capacitação citoplasmática, antes da retomada da meiose, como forma de proporcionar tempo adicional para que os oócitos sofram modificações de prematuridade (Hyttel *et al.*, 1997; Lonergan *et al.*, 2000; Albarracín *et al.*, 2005). A butirolactona I, adicionada na pré-maturação, é uma das substâncias que bloqueiam reversivelmente a meiose de oócitos em VG. Isso permite a melhoria da competência oocitária, por proporcionar mais tempo ao oócito para sofrer mudanças necessárias para manterem seu desenvolvimento posterior após a fecundação (Adona e Leal, 2004).

#### 4.3 Maturação citoplasmática de oócitos cultivados em meio MIV convencional ou suplementado com fulerol 50nM

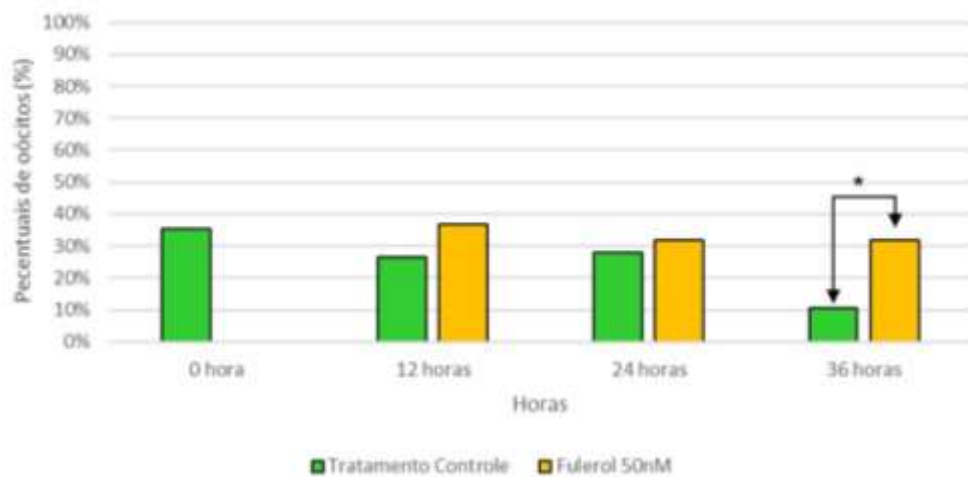
Na Tabela 2 estão os dados de maturação citoplasmática de oócitos, considerando-se como oócitos imaturos o somatório da distribuição mitocondrial homogênea e periférica, e a distribuição heterogênea como de oócitos maduros.

**Tabela 2.** Percentual de oócitos bovinos imaturos ou maduros sob condições de cultivo *in vitro* em meio convencional (TC; n=197) ou suplementado com fulerol 50nM (MF50; n=159), ao longo das horas de incubação (P>0,05).

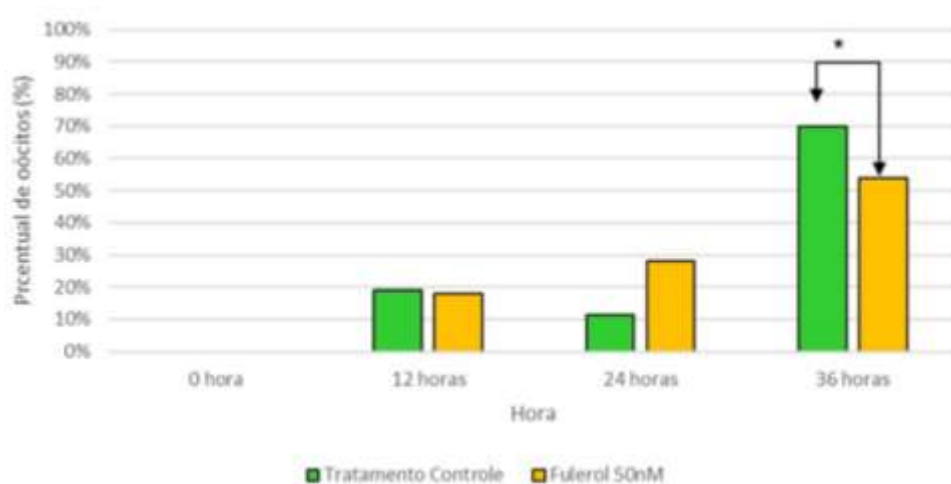
Tempo (horas)	Imaturos (homogênea + periférica)		Maduros (heterogênea)	
	TC	MF50	TC	MF50
<b>0 h</b>	35,4% (n=51)	0,0% (n=0)	0,00% (n=0)	0,00% (n=0)
<b>12 h</b>	26,4% (n=38)	36,6% (n=44)	18,9% (n=10)	17,9% (n=7)
<b>24 h</b>	27,8% (n=40)	31,7% (n=38)	11,3% (n=6)	28,2% (n=11)
<b>36 h</b>	10,4% (n=15)	31,7% (n=38)	69,8% (n=37)	53,9% (n=21)
<b>TOTAL</b>	100,0% (n=144)	100,0% (n=120)	100,0% (n=53)	100,0% (n=39)

À 0 hora não foram encontrados oócitos considerados com maturidade citoplasmática, uma vez que após seleção microscópica, os mesmos foram fixados para coloração e não submetidos aos dois tratamentos. Nos horários subsequentes, verificou-se aumento do percentual de maturidade citoplasmática, sem diferença (P>0,05) entre os dois tratamentos.

Nos Gráficos 3 e 4 pode-se verificar a distribuição de oócitos citoplasmaticamente considerados imaturos e maduros, respectivamente, após avaliação a intervalos de 12 horas.



**Gráfico 3.** Distribuição percentual de oócitos imaturos (distribuição mitocondrial homogênea + periférica) ao longo das horas de cultivo em condições convencionais (meio controle) ou em meio suplementado com fulerol 50nM (\* $P < 0,05$ ).



**Gráfico 4.** Distribuição percentual de oócitos maduros (distribuição mitocondrial heterogênea) ao longo das horas de cultivo em condições convencionais (meio controle) ou em meio suplementado com fulerol 50nM. \* $P < 0,05$ .

Pode-se observar que houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre o percentual de maturação citoplasmática para os meios controle e suplementado com fulerol 50nM, às 36 horas de incubação. No tratamento controle verificou-se 69,8% de maturação citoplasmática, que foi 16,0% superior ao encontrado no tratamento fulerol 50nM, de 53,9%. Esse resultado sugere que, possivelmente, o fulerol também pode estar atuando no controle da maturação citoplasmática, mas de forma tardia ao verificado para a maturação nuclear pois a diferença só aparece as 36 horas.

Adona (2006) avaliou o efeito do bloqueio meiótico por butirolactona I (10 e 100  $\mu\text{M}$ ) na distribuição de mitocôndrias no citoplasma de oócitos. Os oócitos foram bloqueados por 24 horas e, após, divididos em dois grupos: o primeiro para avaliação imediata e, no outro, os oócitos foram submetidos a 24 horas de MIV, antes da avaliação. No grupo controle a avaliação foi feita a 0 hora e

após 24 horas de MIV. Após 24 horas de bloqueio, os oócitos com distribuição periférica de mitocôndrias perfizeram 81,5% para o grupo butirolactona I 10 $\mu$ M, e 86,9 % grupo butirolactona I 100 $\mu$ M, e foram inferiores ao grupo controle (100%). Após 24 horas de MIV, as mitocôndrias migraram por todo o citoplasma dos oócitos. No grupo controle a migração foi menor (81,5%) que os grupos butirolactona I 10 $\mu$ M (95,2%) e butirolactona I 100 $\mu$ M (98,2%), que não diferiram entre si. Os autores concluíram que embora a butirolactona I bloqueie a meiose, a migração mitocondrial não é totalmente bloqueada.

Baseado no estudo citado e nos dados do presente trabalho, sugere-se que apesar do fulerol interferir bloqueando a maturação nuclear, seu efeito na maturação citoplasmática não tão intenso. Comparado à butirolactona I que é usada como bloqueador meiótico, porém que aparentemente há pouca interferência na maturação citoplasmática, o fulerol na concentração de 50nM também mostrou ação semelhante.

#### 4.4 Maturação nuclear e citoplasmática de oócitos cultivados em meio MIV convencional ou suplementado com fulerol 50nM

As tabelas 3 e 4 contém os dados numéricos e a figura 11 ilustra graficamente as maturações do núcleo (Figura 11A e Figura 11B), do citoplasma (Figura 11C e Figura 11D), e do núcleo e citoplasma em conjunto (Figura 11E e Figura 11F), dos tratamentos controle e suplementado com fulerol 50nM, respectivamente.

**Tabela 3.** Percentual de oócitos do tratamento controle cultivados *in vitro* e avaliados conjuntamente quanto à maturação nuclear e citoplasmática.

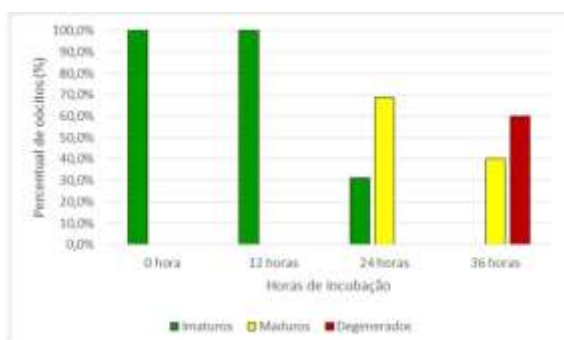
Tempo (horas)	% Maturação Nuclear (n)						% Maturação Citoplasmática (n)		
	VG	QVG	MI	MII	DEG	Total	Imaturo	Maduro	Total
0 h	47,1 (n=24)	52,9 (n=27)	0,0 (n=0)	0,0 (n=0)	0,0 (n=0)	100,0 (n=51)	70,6 (n=36)	29,4 (n=15)	100,0 (n=51)
12 h	52,9 (n=9)	47,1 (n=8)	0,0 (n=0)	0,0 (n=0)	0,0 (n=0)	100,0 (n=17)	82,4 (n=14)	17,6 (n=3)	100,0 (n=17)
24 h	0,0 (n=0)	0,0 (n=0)	31,3 (n=5)	68,8 (n=11)	0,0 (n=0)	100,0 (n=16)	68,8 (n=11)	31,3 (n=5)	100,0 (n=16)
36 h	0,0 (n=0)	0,0 (n=0)	0,0 (n=0)	40,0 (n=10)	60,0 (n=15)	100,0 (n=25)	40,0 (n=10)	60,0 (n=15)	100,0 (n=25)

**Tabela 4.** Percentual de oócitos do tratamento Fulerol 50nM cultivados *in vitro* e avaliados conjuntamente quanto à maturação nuclear e citoplasmática.

Tempo (horas)	% Maturação Nuclear (n)						% Maturação Citoplasmática (n)		
	VG	QVG	MI	MII	DEG	Total	Imaturo	Maduro	Total
12 h	38,9 (n=7)	61,1 (n=11)	0,0 (n=0)	0,0 (n=0)	0,0 (n=0)	100,0 (n=18)	72,3 (n=13)	27,8 (n=5)	100,0 (n=18)
24 h	26,7 (n=4)	6,7 (n=1)	6,7 (n=1)	60,0 (n=9)	0,0 (n=0)	100,0 (n=15)	66,7 (n=10)	33,3 (n=5)	100,0 (n=15)
36 h	31,3 (n=5)	6,3 (n=1)	12,5 (n=2)	50,0 (n=8)	0,0 (n=0)	100,0 (n=16)	56,3 (n=9)	43,8 (n=7)	100,0 (n=16)

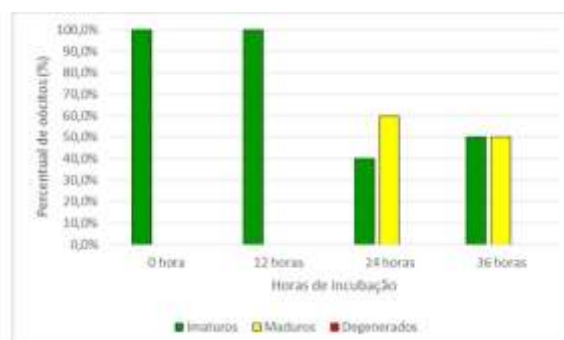
### Tratamento Controle

#### A) Maturação Nuclear

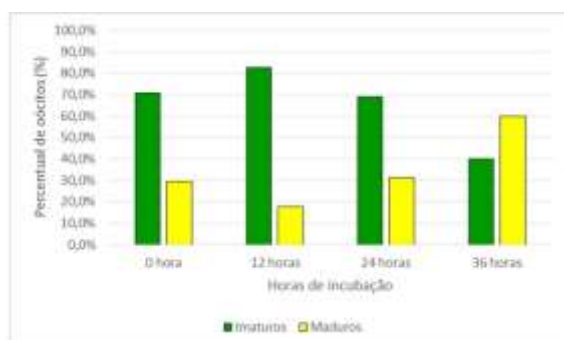


### Tratamento Fulero 50nM

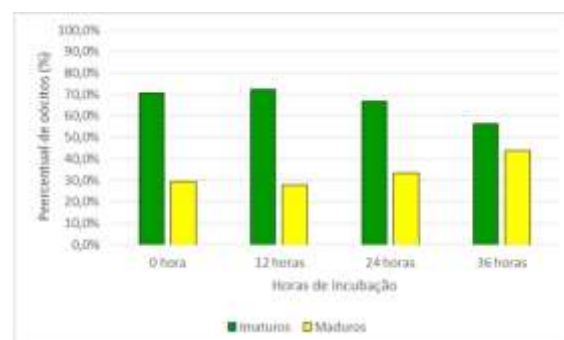
#### B) Maturação Nuclear



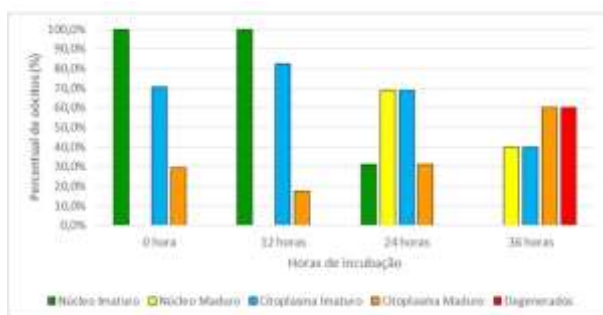
#### C) Maturação Citoplasmática



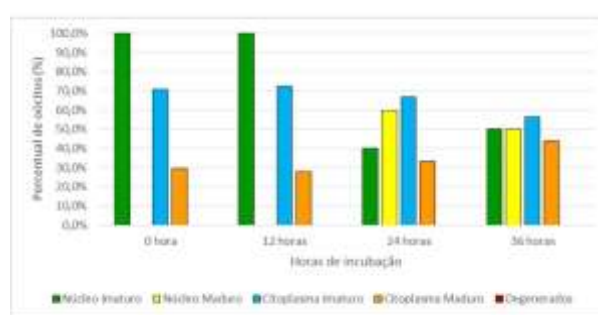
#### D) Maturação Citoplasmática



#### E) Maturação Nuclear e Citoplasmática



#### F) Maturação Nuclear e Citoplasmática



**Figura 11:** Avaliação temporal da maturação nuclear e citoplasmática *in vitro* de oócitos bovinos dos tratamentos controle e fulero 50nM.

No presente estudo, para as duas avaliações, as imagens foram tomadas dos mesmos oócitos ao longo das horas de maturação *in vitro*. Para o grupo controle, à 0 hora que coincide com o momento após aspiração folicular e seleção dos oócitos, verificou-se que 100% dos oócitos se encontravam com núcleo imaturo e, até esse momento, os mesmos não foram submetidos a nenhum tratamento, o que explica o perfil gráfico entre eles. A partir desse momento, após aplicação dos tratamentos, ainda, assim, 100% dos oócitos permaneceram imaturos até às 12h de cultivo para os dois tratamentos.

No tratamento controle pode-se destacar que com 24 horas de MIV, 68,8% dos oócitos estão em MII mas, não necessariamente, tiveram correspondência da maturação citoplasmática. Essa última apresenta curva ascendente de maturação das 24h (30%) para 36h (60%) de cultivo. Às 36 h verificou-se elevado percentual (60%) de oócitos degenerados e, nesse tempo de incubação, 60,0% dos oócitos apresentaram distribuição heterogênea das mitocôndrias ativas, caracterizando maturidade citoplasmática. Pode-se questionar se esse paralelismo seria devido a maturações assíncronas entre citoplasma e núcleo ou se são mudanças degenerativas do oócito.

De modo semelhante, para os oócitos maturados *in vitro* em meio suplementado com 50nM de fulerol, a maturação nuclear ocorreu em maior percentual das 24h (60,0%) até as 36h (50,0%), assim como observado no tratamento controle, porém, com percentual inferior. A maturação citoplasmática também ocorreu em maior percentual das 24h (33,3%) para 36h (43,8%) de incubação *in vitro*, quando as mitocôndrias ativas estiveram heterogeneamente distribuídas pelo citoplasma. Às 36 horas, 50% dos oócitos se encontravam em metáfase II e 50% permaneciam imaturos, enquanto na maturação citoplasmática aproximadamente 60% encontra-se imaturo. Não foram verificados oócitos degenerados para o tratamento fulerol 50nM.

Em trabalho recente, Pei e colaboradores (2019) estudaram o efeito do fulerol na inflamação e osteoartrite (OA) em camundongos *in vivo* e *in vitro*. *In vitro*, macrófagos peritoniais primários e uma linhagem de macrófagos foram estimulados a fenótipos inflamatórios por lipopolissacarídeo (LPS), na presença de fulerol. *In vivo* foi induzida a osteoartrite, por meio de injeções intra-articulares de monoiodoacetato no joelho, e o fulerol foi administrado por via intravenosa após a indução da inflamação. Os autores verificaram que o fulerol reduziu significativamente a produção de óxido nítrico (ROS mediador da inflamação da OA) e a expressão gênica pró-inflamatória induzida pelo LPS, além de inibir a fosforilação de p38 MAPK (molécula promotora de inflamação).

Tomando como base o estudo citado anteriormente, realizado em outro tipo celular, o fulerol atuou reduzindo os níveis ROS e inibindo a fosforilação de MAPK. Prata (2019) verificou que essa substância usada como antioxidante na MIV de oócitos diminuiu a quantidade de células apoptóticas desses gametas. Sendo assim, o fulerol ao reduzir as concentrações de ROS em oócitos, sugere-se que sua ação no oócito seja semelhante ao do estudo de Pei e colaboradores (2019), de forma que a nanopartícula possivelmente iniba a via MAPK e, conseqüentemente, bloqueie a QVG.

Lei *et al.* (2018) investigaram o efeito do fulerol no início da retomada da meiose em oócitos de camundongos. Os animais foram superovulados e, em seguida, oócitos em VG circundados por células foram coletados por meio de aspiração. Eles foram cultivados por cinco horas em meio de maturação, sem ou nas concentrações de 1, 10 e 100µg/mL de fulerol, sendo essa última concentração

equivalente ao dobro da usada nesse presente estudo. Eles verificaram que a nanopartícula reduziu as projeções transzonais (TPZ). Com meia hora de cultivo, oócitos expostos a concentração de 10µg/mL apresentaram redução significativa de AMPc, sendo que a concentração mais baixa foi observada na dose 100µg/mL de fulerol. Também, verificou-se diminuição da expressão de connexin 43 (CX43), que são proteínas de junções comunicantes envolvidas no crescimento folicular, em células do *cumulus* na concentração de 100µg/mL, que acarreta também na perda de TPZ. A taxa de QVG aumentou significativamente em gametas expostos ao fulerol: 1µg/mL (87,7%), 10µg/mL (89,8%) e 100µg/mL (90,0%), comparado ao controle (80,3%) de forma a evidenciar que seu efeito é dose dependente.

O fulerol interferiu na retomada da meiose pela oclusão do domínio extracelular do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) para inibir a ligação do ligante EGFR e induzir a distribuição perinuclear de CX43 e EGFR. A CX43 é uma conexina que, quando ausente, os folículos ficam retidos no início do período de estágio pré-antral, produzindo oócitos incompetentes. O fulerol desativa a função de CX43. Foi sugerido também por esses autores que o fulerol possa interagir passivamente com receptores celulares, modulando especificamente a transdução de sinal por vias de ativação ou inibição (Lei *et al.*, 2018)

Diferentemente do trabalho citado que foi realizado com oócitos de camundongos, o presente estudo foi desenvolvido com oócitos de bovinos cultivados na metade da dose máxima de fulerol utilizada por Lei *et al.* (2018), além do tempo de MIV que foi superior (36 horas). A nanopartícula atenuou a QVG em oócitos bovinos cultivados por 36 horas. Isso leva a sugerir que o fulerol, além de possuir efeito dose e tempo de exposição dependente, atua também de forma distinta de acordo com tipo e composição celular relacionada a espécie animal, possivelmente pela diferença na composição celular e processo de maturação. Provavelmente, o fulerol atua retardando a maturação nuclear e diminuindo a maturação citoplasmática, quando adicionado ao meio de MIV de oócitos bovinos. O intervalo de tempo para sua atuação celular ainda não foi estabelecido, mas tudo indica que existe maior intervalo de tempo para que ele possa atuar efetivamente na célula, de modo responder à sua ação que, no presente caso, foi no intervalo de 6 a 18 horas, quando seu efeito foi expressivo. Novas pesquisas deverão ser realizadas a fim de determinar o possível mecanismo de ação do fulerol no bloqueio da meiose de oócitos, bem como se esse processo é reversível.

## 5. Conclusões

A adição de 50nM de fullerol ao meio de maturação *in vitro* retardou a progressão meiótica e a maturação citoplasmática dos oócitos bovinos;

O fullerol parece interferir no mecanismo de expansão das células do *cumulus oophorus*, uma vez que foi verificada dificuldade de desnudamento dos oócitos, durante a rotina laboratorial.

## 6. Perspectivas Futuras

O fullerol, se confirmado experimentalmente que possui função reversível no bloqueio da meiose em oócitos bovinos, poderá ser utilizado em rotinas laboratoriais de PIVE como forma incrementar a competência de desenvolvimento posterior de oócitos. Porém, mais estudos devem ser realizados com o intuito de ajustar a dose e tempo de ação ideais, assim como elucidar a via que essa nanopartícula utiliza no gameta feminino para retardar a retomada da meiose *in vitro*. E, posteriormente, apresentar a contribuição do seu uso nos resultados da produção *in vitro* de embriões.

## 7. Referências Bibliográficas

- ADONA, P. R. Bloqueio da meiose com butirolactona I em ovócitos bovinos: efeitos sobre a maturação nuclear e citoplasmática. 78f. 2006. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ.
- 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. et al. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 108, p. 49-65, 2008.
- ALBARRACÍN, J.L.; MORATÓ, R.; IZQUIERDO, D. et al. Effects of roscovitine on the nuclear and cytoskeletal components of calf oocytes and their subsequent development. *Theriogenology*, v.64, p.1740–55, 2005.
- ALBERTINI, D.F. Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. *Mutat. Res.*, v. 296, p. 57–68, 1992.
- ANDERSON, E.; ALBERTINI, D.F. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J. Cell. Biol.*, v. 71, p. 680-686, 1976.
- BARRETTO, L.S.S.; CAIADO, C.V.S.D.; GARCIA, J.M. et al. Role of roscovitine and IBMX on kinetics of nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 99, p. 202–207, 2007.
- BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. *Theriogenology*, v.60, p.1679-1690, 2003.
- BILODEAU-GOESEELS, 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*. *J. Reprod. Fertil.*, v.97, p.5-11, 1993.
- BOSI, S.; DA ROS, T.; SPALLUTO, G. et al. Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 38, p. 913–923, 2003.
- CARABATSOS, M.J.; SELBITTO, C.; GOODENOUGH, D.A. et al. Oocyte-granulosa cell hereologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Develop. Biol.*, v.226, p.167–79, 2000.
- CENTOLA, G. M.; ANDERSON, L. D.; CHANNING, C. P. Oocyte maturation inhibition activity in porcine granulosa cells. *Gamete Res*, v. 4, p. 451-462, 1981.
- CONTI, M.; HSIEH, M.; ZAMAH, A. M. et al. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol. Cell Endocrinol.*, v. 356, p. 65-73, 2012.
- DAVID, F.A. The Mammalian Oocyte (Cap. 2). In: Knobil and Neill's. Physiology of Reproduction, vol. 1, 4<sup>th</sup> edition, Academic Press., p. 2684, 2014.
- DEDIEU, T.; GALL, L.; CROZET, N. et al. Mitogen-Activated Protein Kinase Activity During Goat Oocyte Maturation and the Acquisition of Meiotic Competence. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 358, p. 351-358, 1996.
- DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Mol. Cel. Endocr.*, v. 234, p. 19-25, 2005.



- DEKEL, N. Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. *Reproduction*, v. 1, p. 82-88, 1996.
- DORDEVIĆ, A.; BOGDANOVIĆ, G. Fullerenol: A new nanopharmaceutic? *Int. J. Oncol.*, v. 16, p. 42-45, 2008.
- DOWNS, S.M. The influence of glucose, cumulus cells, and metabolic coupling on ATP levels and meiotic control in the isolated mouse oocyte. *Devel. Biol.*, v. 167, p. 502-512, 1995.
- 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. *Develop. Biol.*, v. 172, p. 72-85, 1995.
- DRAGOVIC, R.A.; RITTER, L.J.; SCHULZ, S.J.; et al. Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology*, v. 146, p. 2798–2806, 2005.
- DURLINGER, A.L.L.; VISSER, J.Á.; THEMME, A.P.N. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction*, v.124, p.601-609, 2002.
- EDWARDS, J.L.; SAXTON A.M.; LAWRENCE J. L. et al. Exposure to a physiologically relevant elevated temperature hastens *in vitro* maturation in bovine oocytes. *J. Dairy Sci.*, v.88, p. 4326–4333, 2005.
- EDWARDS, R.G. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus, monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, v.208, p.349-351, 1965.
- EICHENLAUB-RITTER, U.; PESCHKE, M. Expression in *in-vivo* and *in-vitro* growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. *Hum. Reprod.*, v.8, p.21–41, 2002.
- EYERS, P.A.; LIU, J.; HAYASHI, N.R. et al. Regulation of the G(2)/M transition in *Xenopus* oocytes by the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, v. 28, p. 339-346, 2005.
- FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R. et al. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I reversibly arrests meiosis without increasing meiotic abnormalities after *in vitro* maturation. *Europ. J. Obst. Gynec. Reprod. Biol.*, v.145, p. 76–80, 2009.
- FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, v.71, p.836–848, 2009.
- GAUTIER, J.; NORBURY, C.; LOHKA, M. et al. 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, 1988.
- GILCHRIST, R.B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: Regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum. Reprod.*, v.14, p.159–177, 2008.
- GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M. et al. Selection of the Dominant Follicle in Cattle. *Biol. Reprod.*, v.55, p.1187-1194, 1996.
- GLISTER, C., TANNETTA, D.S.; GROOME, N.P. et al. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. *Biol. Reprod.*, v.65, p.1020–1028, 2001.
- GONÇALVES, P.B.D.; VISITIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L. et al. Produção *in vitro* de embriões. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. Editora Rocca, São Paulo, p. 261-301, 2008.

- GORDO, A.C.; HE, C.L.; SMITH, S. et al. Mitogen Activated Protein Kinase Plays a Significant Role in Metaphase II Arrest, Spindle Morphology, and Maintenance of Maturation Promoting Factor Activity in Bovine Oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, v.114, p.106–114, 2001.
- GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. Bovine oocyte maturation and influence on subsequent embryonic developmental competence. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.33, p.82-94, 2009.
- GUEMRA, S.; SILVA SANTO, E.; ZANIN, R. et al. Effect of temporary meiosis block during prematuration of bovine cumulus-oocyte complexes on pregnancy rates in a commercial setting for *in vitro* embryo production. *Theriogenology*, v.81, p.982-7, 2014.
- GUERRA, M. O., Reprodução Feminina Fisiologia de Hipotálamo, Hipófise e Ovário. 1. Ed. Editar, Juiz de Fora, p. 1-96, 2001.
- HAFEZ, E.S.E. Foliculogênese, maturação do ovo e ovulação (Cap. 5). In: HAFEZ, E. S. E. Reprodução Animal, 6ª Edição. São Paulo-SP: Editora Manole Ltda., p. 582, 1995.
- HALEY, S.A.; WESSEL, G.M. Regulated proteolysis by cortical granule serine protease 1 at fertilization. *Mol. Cell. Biol.*, v.15, p.2084–2092, 2004.
- HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; TAKAKURA, R. et al. Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest *in vitro*. *Biol. Reprod.*, v.66, p.1696-1701, 2002.
- HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. *Intern. Ver. Cytol.*, v.124, p.43–101, 1991.
- HOMA, S.T. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Mol. Reprod. Dev.*, v.40, p.22-134, 1995.
- HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. *Zygote*, v.5, p.371–376, 1997.
- HUANG, W.; NAGANO, M.; KANG, S.S. et al. Effects of *in vitro* growth culture duration and prematuration culture on maturational and developmental competences of bovine oocytes derived from early antral follicles. *Theriogenology*, v.80, p.793–799, 2013.
- HURK, D.V.R.; BEVERS, M.M.; BECKERS, J. F. *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. *Theriogenology*, v. 47, p. 73–82, 1997.
- HURK, D.V.R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v. 63, p. 1717-1751, 2005.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLENSSEN, H. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, v.47, p.23–32, 1997.
- HYTTEL, P.; XU, K.P.; SMITH, S. et al. Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. *J. Reprod. Fert.*, v.78, p.615–625, 1986.
- JAMNONGJIT, M.; HAMMES, S.R. Oocyte Maturation: The Coming of Age of a Germ Cell. *Semin. Reprod. Med.*, v.23, p.234–241, 2006.
- JESETA, M.; CTVRTLIKOVA-KNITLOVA, D.; HANZALOVA, K. et al. Mitochondrial patterns in bovine oocytes with different meiotic competence related to their *in vitro* maturation. *Reprod. Dom. Anim.*, v.49, p.467-475, 2014.
- JOSEFSBERG, L.B.; GALIANI, D.; LAZAR, S. et al. MPF governs MAPK activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. *Biol. Reprod.*, v.68, p.282-290, 2003.
- JUENGEL, J.L.; SAWYER, H.R.; SMITH, P.R. et al. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.191, p.1–10, 2002.

- KANITZ, W.; BRÜSSOW, K.P.; BECKER, F. et al. Comparative aspects of follicular development, follicular and oocyte maturation and ovulation in cattle and pigs. *Arch. Anim. Breed.*, v.44, p.9–23, 2001.
- KASTELIC, J.P. Folliculogenesis in cattle. *Biocologia da Reprodução em Bovinos (1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada)*. 2012.
- KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; ALM, H.; TORNER, H. et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity in *in vitro* cultured bovine oocytes recovered from early antral ovarian follicles. *Theriogenology*, v.75, p.662–670, 2011.
- KROTO, H.W.; HEATH, J. R.; O'BRIEN, S. C. et al. C60 Buckminster fullerene. *Nature*, v.318, p.162-163, 1985.
- KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R.M. et al. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. *Biol. Reprod.*, v.62, p.292-302, 2000.
- LADEIRA, M. S. Nanotecnologia aplicada ao sistema cardiovascular: Efeito do fulerol no estresse oxidativo. 2013. 114f. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- LEI, R.; BAI, X.; CHANG, Y. et al. Effects of Fullerenol Nanoparticles on Rat Oocyte Meiosis Resumption. *Int. J. Mol. Sci.*, v.19, p.1-15, 2018.
- LI, R.; NORMAN, R.J.; ARMSTRONG, D.T. et al. Oocyte-Secreted Factor(s) Determine Functional Differences Between Bovine Mural Granulosa Cells and Cumulus Cells. *Biol. Reprod.*, v.63, p.839–845, 2000.
- LICHOTA, A.; KROKOSZ, A. Fulerenole w terapii i diagnostyce chorób nowotworowych. *Medycyna Pracy*, v.67, p.817–831, 2016.
- LONERGAN, P.; DINNY'ES, A.; FAIR, T. et al. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. *Mol. Reprod. Dev.*, v.57, p. 204–209, 2000.
- LUCIANO, A.M.; POCAR, P.; MILANESI, E. et al. Effect of different levels of intracellular cAMP on the *in vitro* maturation of cattle oocytes and their subsequent development following *in vitro* fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, v.54, p.86-91, 1999.
- MARQUES, M.G.; MELLO, M.R.B.; TAVARES, L.M.T. et al. Maturação e desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos após bloqueio da meiose com inibidores da MPF. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.48, p.468-477, 2011.
- MC-GEE, E.A.; HSU, S.Y.; KAIPIA, A. et al. Cell death and survival during ovarian follicle development. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.140, p.15-18, 1998.
- MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R. et al. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. *Mol. Reprod. Dev.*, v.55, p.89-95, 2000.
- MOCHLY-ROSEN, D. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction (Signal Transduction). *Science*, v.268, p.247-55, 1995.
- NOGUEIRA, D.; ALBANO, C.; ADRIAENSES, T. et al. Human oocytes reversibly arrested in prophase I by phosphodiesterase type 3 inhibitor *in vitro*. *Biol. Reprod.*, v.69, p.1042-1052, 2003.
- OKTAY, K.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R.G. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 82, p.3748–3751, 1997.

- OLIVEIRA, E. G.; Polisseni, J.; GUERRA, M. O.; PETERS, V. M. Physiological and biochemical mechanism involved in ovogenesis. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*, v. 1, p. 29-33, 2009.
- PEARSON, G.; ROBINSON, F.; BEERS, G. T. et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.*, v.22, p.153–83, 2001.
- PEI, Y.; CUI, F.; DU, X. et al. Antioxidative nanofullerol inhibits macrophage activation and development of osteoarthritis in rats. *Internat. J. Nanom.*, v.14, p.4145–4155, 2019.
- PICKERING, K.D; WIESNER, M.R. Fullerol-Sensitized Production of Reactive Oxygen Species in Aqueous Solution. *Environ. Sci. Technol.*, v.39, p.1359-1365, 2005.
- PINCUS, G.; ENZMANN, E.V. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. *The J. Exper. Med.*, v.62, p.655–675, 1935.
- PONDERATO, N.; CROTTI, G.; TURINI, P. et al. Embryonic and foetal development of bovine oocytes treated with a combination of butyrolactone I and roscovitine in an enriched medium prior to IVM and IVF. *Mol. Reprod. Devel.*, v.62, p.513–518, 2002.
- POPELKOVA, M.; SIROTKIN, A.V.; BEZAKOVA, A. et al. Effect of IGF-I, leptin, ghrelin and MAPK-ERK on the nuclear maturation of bovine oocytes. *Bull. Vet. Res. Inst. Pulawy.*, v.50, p. 179-181, 2006.
- PRATA, V.M.D.R. Efeito da adição do fullerol ao meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos. 2019. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- RAMOS, G.S. Atividade Antileishmania do fullerol e efeito hepatoprotetor na quimioterapia antimonial em modelo murino de leishmaniose visceral. 2014. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- RANCAN, F.; ROSAN, S.; BOEHM, F. et al. Cytotoxicity and photocytotoxicity of a dendritic C<sub>60</sub> mono-adduct and a malonic acid C<sub>60</sub> tris-adduct Jurkat cells. *J. Photoch. Photobio.*, v.67, p.157–162, 2002.
- RICHARD, F. J. Regulation of meiotic maturation. *Journal of Animal Science*, v. 85, p. 4-6, 2007.
- RICHARD, F.J.; SIRARD, M.A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. *Biol. Reprod.*, v.54, p.22-28, 1996.
- ROUX, P.P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol.*, v.68, p.320-344, 2004.
- RYBSKA, M.; KNAP, S.; JANKOWSKI, M. et al. Cytoplasmic and nuclear maturation of oocytes in mammals—living in the shadow of cells developmental capability. *Med. J. Cell Biol.*, v.6, p.13–17, 2018.
- SALUSTRI, A.; ULISSE, S.; YANAGISHITA, M. et al. Hyaluronic acid synthesis by mural granulosa cells and cumulus cells *in vitro* is selectively stimulated by a factor produced by oocytes and by transforming growth factor- $\beta$ . *J. Biol. Chem.*, v. 265, p. 19517–19523, 1990.
- SANTOS, L.J.; ROCHA, G.P.; ALVES, R.B. et al. Fullereno [C<sub>60</sub>]. *Quim. Nova*, v. 33, p. 680–693, 2010.
- SCHIMMEL, T.G.; COFFMAN, A.D.; PARSONS, S.J. Effect of Butyrolactone I on the Producing Fungus, *Aspergillus terreus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 64, p. 3707–3712, 1998.
- SCHOPF, P.F.; SILVA, I.Z.; MARTINS, M.O. Structural and electronic properties of fullerol. *Disciplinarum Scientia*, v. 19, p. 301-307, 2018.

- SELA-ABRAMOVICH, S.; EDRY, I.; GALIANI, D.; *et al.* Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology*, v. 147, n. 5, p. 2280–2286, 2006
- SEMENOV, K.N.; CHARYKOV, N.A.; POSTNOV, V.N. *et al.* Fullerenols: Physicochemical properties and applications. *Prog. Stat. Chem.*, v. 30, p. 1-16, 2016.
- SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, v. 55, p. 1241–54, 2001.
- SIRARD, M.A.; FIRST, N.L. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol. Reprod.*, v. 39, p. 229-234, 1988.
- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology*, v. 49, p. 483-497, 1998.
- SKINNER, M.K. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproduction Update*, v. 11, n. 5, p. 461-471, 2005.
- STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; STOJKOVIC, P. *et al.* Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biol. Reprod.*, v. 64, p. 904–909, 2001.
- SUDANO, M.J.; SANTOS, V.G.; TATA, A. *et al.* Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* *in vitro* and *in vivo*-produced blastocysts. *Biol. Reprod.*, v. 87, p. 1-11, 2012.
- SUTTON, M.; GILCHRIST, R.; THOMPSON, J. Effect of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction Update*, v. 9, n. 1, p. 35–48, 2003.
- TRIMARCHI, J.R.; LIU, L.; PORTEFIELD, D.M. *et al.* Oxidative phosphorylation-dependent and independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol. Reprod.*, v. 62, p. 1866–1874, 2000.
- TROUNSON, A.; ANDERIESZ, C.; JONES, G. Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. *Reproduction*, v. 121, p. 51–75, 2001.
- TSAFRIRI, A.; CHUN, S.Y.; ZHANG, R. *et al.* Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: Studies using selective phosphodiesterase inhibitors. *Develop. Biol.*, v. 178, p. 393-402, 1996.
- VERDE, F.; DOGTEROM, M.; STELZER, E. *et al.* Control of microtubule dynamics and length by cyclin A-dependent and cyclin B-dependent kinases in *Xenopus* eggs extracts. *J. Cell Biol.*, v. 118, p. 1097-1108, 1992.
- VERLHAC, M.H.; PENNART, H.D.; MARO, B. *et al.* MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Development*, v.158, p.330-340, 1993.
- WATSON, A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J. Anim. Sci.*, v.85, p.1–3, 2007.
- WEBB, R.; GOSDEN, R.G.; TELFER, E.E. *et al.* Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *Anim. Sci.*, v. 68, p. 257–284, 1999.
- ZUCCOTTI, M.; MERICO, V.; CECCONI, S. *et al.* What does it take to make a developmentally competent mammalian egg? *Hum. Reprod.*, v. 17, p. 525–540, 2011.