

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO**

EDGAR MAURICIO MOGOLLÓN WALTERO

**INIBIÇÃO DA FOSFATIDIL INOSITOL 3 QUINASE (PI3K) NA
MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS**

Campos dos Goytacazes - RJ

Julho /2013

EDGAR MAURICIO MOGOLLÓN WALTERO

**INIBIÇÃO DA FOSFATIDIL INOSITOL 3 QUINASE (PI3K) NA
MATURAÇÃO IN VITRO DE OÓCITOS BOVINOS**

Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de doutor em Ciência Animal, na área de concentração de Melhoramento Genético e Biotecnologia da Reprodução.

Orientador: Dr. Ângelo José Burla Dias

Campos dos Goytacazes - RJ

Julho /2013

EDGAR MAURICIO MOGOLLÓN WALTERO

**INIBIÇÃO DA FOSFATIDIL INOSITOL 3 QUINASE (PI3K) NA
MATURAÇÃO IN VITRO DE OÓCITOS BOVINOS**

**Tese de Doutorado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias
Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção
do título de Doutor em Ciência Animal.**

Aprovada em 5 de julho de 2013

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Leonardo Abreu (Doutor em Biociências e Biotecnologia) UFRJ

Prof. Reginaldo da Silva Fontes (Doutor em Ciências Veterinárias) UENF

Prof^a. Raquel Varella Serapição (Doutora em Produção Animal) PESAGRO

**Prof. Ângelo José Burla Dias (Doutor Biociências e Biotecnologia) – UENF
(Orientador)**

DEDICATÓRIA

A uma terra e uma gente grande, boa e nobre... Brasil;

À minhas filhas, Maria Salome e Juanita Maria, para quem vou seguir tentando ser exemplo de que tudo pode ser alcançado com persistência e dedicação;

**A quem sabe como é difícil a vida comigo, mas ainda assim está presente nela
Amanda Lucía Jiménez Sanz;**

Aos meus pais Olguita e Aquilino, que me ensinaram o verbo amar;

Aos meus irmãos, Oscar Alfredo e Luisa Marina, por me lembrar sempre que a família é incondicional;

A meus sobrinhos; Sebastian, Santiago e Sergio, por incentivar-me, com suas conversas para ser um melhor professor e pelo carinho;

Ao grande Clã Mogollón pela união que sempre nos faz sentir protegidos.

AGRADECIMENTOS

A Darcy Ribeiro, porque, sem seus sonhos, os meus não se tornariam realidade;

A três grandes seres humanos que gostaria de poder alcançar em bondade e sabedoria Ângelo José Burla Dias, Gonzalo Mejía e Roberto Vidal;

Aos meus mestres da graduação, especialmente Jaime Fernando Gonzalez, Alfonso Clavijo, Martha Olivera, Hector Eduardo Gonzalez e Jorge Echeverri. Agora, eu estou tentando passar para outros o exemplo que deles recebi;

Às minhas companheiras e amigas Laura Barroso, Janaina Leite e Aline Glória pela ajuda e tolerância nos momentos difíceis nos experimentos;

Aos meus irmãos na aventura do conhecimento longe de casa Jorge Romero, Hector Narváez, Gina Mican, Diana Cubides, Camila Waltero e Osli Tirado;

À Juli Andrea Narváez, Diego Fernando Dubeibe e Oscar Fernando Tirado por seguirem no caminho da pesquisa em animais;

A Helga Fernandes Gomes e seu esposo Jorge pelo atendimento continuado mesmo além do mar;

Ao Prof. Carlos Jorge Logullo, Leonardo Abreu, Evenilton Pessoa e a todos da Unidade de Experimentação Animal UEA/UENF pela constante ajuda e por receberem um estrangeiro nas suas vidas, como mais um irmão;

Aos técnicos do LRMGA, Carla, Bruna e Marcus pela colaboração e as palavras de alento e amizade, além do café para esquentar a alma nas manhãs;

A Margarete pelo sorriso e por ter mantido meu nível de cafeína adequado para o trabalho nesta travessia de cinco anos;

Ao Sergio Gonzalez e Liliana Martinez, por estar conosco sempre que precisamos;

À Jose Antonio Martinez, Mario Yesid Gonzalez, Mario Roberto Martinez, Daniel Adiro Martinez por ser o apoio nos momentos difíceis;

Ao professor Reginaldo da Silva Fontes por correr o risco de assinar a minha folha de entrada na UENF;

À professora Maria Clara Caldas Bussiere, pela orientação e exemplo de vida;

À professora Celia Raquel Quirino e ao seu esposo, o senhor Emídio, pela constante ajuda para com a minha família;

Ao professor Olney Vieira da Motta, por tentar fazer sempre o mais correto;

Aos operários e proprietários dos abatedouros de Campos dos Goytacazes, Paulinho (FRIGUA), Juarez e o grande Seu Natalino. Sem sua colaboração nosso trabalho não poderia ter sido feito.

RESUMO

MOGOLLÓN, Waltero Edgar Mauricio, MSc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Julho de 2013. Inibição da fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K) na maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Professor orientador: Ângelo José Burla Dias. Coorientadora: Helga Fernandes Gomes.

A maturação oocitária é um processo bem regulado por uma cascata de acontecimentos enzimáticos baseados em vários eventos de fosforilação e desfosforilação como forma de controle da atividade de muitas enzimas envolvidas nessa via. Tem sido demonstrado que a fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K) participa nesse processo regulando a atividade de importantes reações relacionadas à retomada da meiose. Nesse contexto buscou-se verificar a participação da PI3K em eventos relacionados à maturação oocitária em bovinos, visando determinar o efeito do *wortmannin* (inibidor da PI3K) sobre a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos durante a maturação *in vitro*. O grau de atividade da enzima PI3K foi evidenciado por *western blot*. A quantificação da concentração de glicose e glicogênio foi realizada pelo teste Glucox 500. A formação da placa metafásica foi determinada pela coloração com orceína, enquanto a microscopia de epifluorescência foi utilizada para avaliar a viabilidade dos oócitos, formação do fuso meiótico, migração de grânulos corticais e a distribuição de actina. A taxa de formação de blastocistos foi determinada no sétimo dia (D7) do cultivo *in vitro*. O uso do *wortmannin* em concentrações nanomolares produziu inibição parcial da atividade PI3K, porém os níveis de glicose e glicogênio não foram alterados. Também não foram encontradas alterações ($p \geq 0,05$) na viabilidade dos oócitos maturados *in vitro* na presença do inibidor ($72,2 \pm 6,9\%$) em relação aos do controle ($77,6 \pm 8,4 \%$), determinado pela marcação com calceína-AM. Também não foram observadas diferenças na taxa de maturação nuclear, evidenciada pela progressão da meiose até a metáfase II, ($82,0 \pm 12,9 \%$ no controle e $77,7 \pm 21,6 \%$ no *wortmannin*). O tratamento também não promoveu nenhuma alteração na organização do fuso meiótico, na distribuição dos filamentos de actina e das mitocôndrias. No entanto, oócitos tratados com *wortmannin* apresentaram um aumento significativo ($p \leq 0,05$) na taxa de maturação citoplasmática, em relação ao controle ($87,4 \pm 11,4 \%$ x $72,8 \pm$

11,8 %). A taxa de clivagem não foi influenciada pelo tratamento, porém a taxa de blastocistos foi significativamente maior ($p \leq 0,05$) quando os ovócitos foram maturados na presença do *wortmannin* ($34,2 \pm 6,4 \% \times 20,0 \pm 5,0 \%$). Conclui-se que PI3K participa da maturação de oócitos bovinos e que o tratamento dos ovócitos com *wortmannin*, em concentrações nanomolares, acelera a maturação citoplasmática, além de melhorar a taxa de produção dos blastocistos.

Palavras-chave: via da PI3K/AKT, insulina, quinases, maturação citoplasmática, embrião.

ABSTRACT

MOGOLLÓN, Waltero Edgar Mauricio, MSc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. July , 2013. Phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K) inhibition in the in vitro maturation of bovine oocytes. Advisor: Ângelo José Burla Dias. Co-advisor: Helga Fernandes Gomes.

Oocyte maturation is a process tightly regulated by a cascade of enzymatic events based on multiple phosphorylation and dephosphorylation events as a way to control the activity of many enzymes involved in this pathway. It has been shown that the phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) participates in this process regulating the activity of important reactions related to the resumption of meiosis. This context attempted to evaluate the role of PI3K in events related to bovine oocyte maturation, in order to determine the effect of *wortmannin* (PI3K inhibitor) on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes during *in vitro* maturation. The PI3K enzyme activity degree was detected by western blot. Glucose and glycogen concentration was quantified by Glucox 500 test. The metaphase plate formation was determined by orcein staining, while epifluorescence microscopy was used to evaluate oocytes viability, spindle meiotic formation, cortical granules migration and actin distribution. Finally blastocyst rate was determined on the seventh day (D7) of *in vitro* culture. The use of *wortmannin* at nanomolar concentrations produced partial inhibition of PI3K activity, however glucose and glycogen levels were not altered. Were also not found changes in oocyte viability in vitro matured oocytes ($p \geq 0,05$) in the presence of inhibitor with respect to the control determined by calcein-AM staining ($77,6 \pm 8,4\%$ in control and $72,2 \pm 6,9\%$ in inhibitor group), as well as the nuclear maturation rate, evidenced by the progress of meiosis until metaphase II ($82,0 \pm 12,9\%$ in control and $77,7 \pm 21,6\%$ in *wortmannin* group). The treatment also did not provide changes in the organization of the meiotic spindle in the distribution of actin filaments and mitochondria. However, oocytes treated with *wortmannin* presented a significant increase ($P \leq 0.05$) in the cytoplasmic maturation rate respect to control ($72,8 \pm 11,8\%$ in control and $87,4 \pm 11,4\%$ in the inhibitor group) The cleavage rate was not affected by treatment, although the blastocyst rate was significantly higher ($p \leq 0.05\%$) when oocytes were matured in the presence of *wortmannin* (control $20.0 \pm$

5.0% and inhibitor $34.2 \pm 6.4\%$). In conclusion the PI3K participate in the bovine oocytes maturation and their inhibition with *wortmannin* at nanomolar concentrations, affects cytoplasmic maturation by accelerating cortical granules movement, and improving the blastocyst rate.

Keywords: PI3K/AKT pathway, insulin, kinases, cytoplasmic maturation, embryo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do ciclo celular.....	20
Figura 2. Esquema demonstrativo do processo de ativação do Fator Promotor da Maturação.....	22
Figura 3. Esquema da participação da MAPK no processo de ativação do MPF.....	24
Figura 4. Via da sinalização pela qual a insulina ativa a PI3K e inibe a GSK-3.....	26
Figura 5. Progressão da maturação nuclear e movimentação de organelas	31
Figura 6. Regulação cooperativa das pequenas GTPases.....	38
Figura 7. Fórmula estrutural do <i>wortmannin</i>	41
Figura 8. Efeito do <i>wortmannin</i> na atividade da CDC2 quinase.....	42
Figura 9. Coloração com orceína acética.....	46
Figura 10. Marcação de grânulos corticais com FITC- <i>Lens culinaris</i>	47
Figura 11. Marcação fluorescente de oócitos bovinos maturados in vitro com calceína e iodeto de propídio.....	50
Figura 12. Oócitos maturados marcados com alfa tubulina.....	51
Figura 13. Oócitos maturados marcados com faloidina.....	51
Figura 14. Análise densitométrica das bandas proteicas da subunidade P-85.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Progressão da meiose de oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i> na presença do <i>wortmannin</i>	54
Tabela 2. Percentual de oócitos que atingiram a maturação citoplasmática após 22 horas de maturação <i>in vitro</i>	55
Tabela 3. Efeito do tratamento de oócitos bovinos com <i>wortmannin</i> durante a maturação <i>in vitro</i> , sobre a concentração de glicose e glicogênio.....	57
Tabela 4. Viabilidade de oócitos bovinos tratados com <i>wortmannin</i> após 22 horas de maturação <i>in vitro</i>	58
Tabela 5. Padrão de distribuição mitocondrial em oócitos bovinos tratados com <i>wortmannin</i> durante a maturação <i>in vitro</i>	59
Tabela 6. Padrão de distribuição de microfilamentos de actina em oócitos bovinos tratados com <i>wortmannin</i> durante a maturação <i>in vitro</i>	59
Tabela 7. Influência do <i>wortmannin</i> nas taxas de clivagem e de blastocistos bovinos.....	60

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	15
2.OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 FOLICULOGÊNESE E OOGÊNESE.....	18
3.2 CICLO CELULAR.....	19
3.2.1 Ciclo mitótico.....	20
3.2.2 Ciclo meiótico.....	21
3.3 REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR	22
3.3.1 Fator promotor da fase M (MPF).....	22
3.3.2 Proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK).....	23
3.3.3 Via da PI3K/AKT.....	25
3.4 MATURAÇÃO IN VITRO DOS OÓCITOS.....	26
3.4.1 Maturação nuclear.....	28
3.4.2 Maturação citoplasmática.....	29
3.4.2.1 Redistribuição de organelas.....	29
3.4.5.2 Movimentação de filamentos do citoesqueleto.....	32
3.4.3 Maturação molecular.....	33
3.5 FOSFATIDIL INOSITOL 3 QUINASE (PI3K).....	34
3.5.1 Influência da PI3K na maturação oocitária.....	35
3.5.1.1 Regulação dos níveis de glicose e glicogênio.....	36
3.5.1.2 Regulação da concentração intra- oocitária de AMPc.....	37
3.5.1.3 Remodelação do citoesqueleto e GTPases.....	37
3.5.1.4 Interação com as GTPases.....	39
3.5.1.5 Inibição da apoptose.....	40
3.5.2 <i>Wortmannin</i> inibidor químico da PI3K.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 LOCAIS DE EXECUÇÃO.....	44
4.2 OBTENÇÃO DOS OÓCITOS.....	44

4.3 CLASSIFICAÇÃO DOS OÓCITOS.....	44
4.4 MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	45
4.4.1 Avaliação da maturação nuclear.....	45
4.4.2 Avaliação da maturação citoplasmática.....	46
4.5 QUANTIFICAÇÃO DA PI3K POR WESTERN-BLOT.....	48
4.6 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE E GLICOGÊNIO NOS OÓCITOS.....	49
4.7 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE OOCITÁRIA.....	50
4.8 AVALIAÇÃO DO CITOESQUELETO.....	50
4.9 FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i>	52
4.10 CULTIVO <i>IN VITRO</i>	52
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	53
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
7.1 AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR.....	54
7.2 AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA.....	55
7.3 EFEITO DO <i>WORTMANNIN</i> SOBRE A ATIVIDADE DA PI3K.....	56
7.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE E GLICOGÊNIO	57
7.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE OOCITÁRIA.....	58
7.6 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE ACTINA E MITOCÔNDRIAS.....	59
7.7 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	60
8. CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

O uso mais intensivo de biotecnologias da reprodução como a inseminação artificial, a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIV) tem contribuído de forma significativa para a multiplicação de genótipos mais produtivos e a elevação da eficiência reprodutiva do rebanho bovino, o que está diretamente ligado a incrementos na receita, sendo esses fatores decisivos para a sustentabilidade da atividade.

A PIV é uma importante ferramenta de multiplicação de genótipos superiores que permite ganhos genéticos mais rápidos que os obtidos com a inseminação artificial, pois utiliza conjuntamente o potencial genético do touro e da doadora.

Atualmente o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de embriões bovinos produzidos *in vitro*, com 86% do total da produção mundial em 2011, além de responder por aproximadamente 25 % do total de transferências realizadas no mundo (IETS, 2012).

Apesar da grande expansão observada na produção *in vitro* de embriões bovinos nos últimos anos, a técnica ainda não atingiu seu pleno potencial, visto que apenas 30-40% dos ovócitos colocados para maturação *in vitro*, atingem o estágio de blastocisto (RIZOS *et al.*, 2002a).

A maturação *in vitro* é um dos principais problemas da produção *in vitro* de embriões, sendo os meios e as condições da maturação objetos permanentes de estudo (RIZOS *et al.*, 2002a ; KANE, 2003; FERNANDEZ *et al.*, 2007).

Das três etapas (maturação, fertilização e cultivo) da produção *in vitro* de embriões, a etapa da maturação está diretamente relacionada com a quantidade de embriões produzidos. Rizos *et al.* (2002b) utilizaram ovócitos maturados *in vivo* e *in vitro* para a produção de embriões, alcançando resultados de 58,2 % e 39,2 % de blastocistos, respectivamente. Estes resultados indicam que os métodos atuais de maturação *in vitro* ainda podem ser melhorados.

A inadequada maturação do oócito reduz as taxas de fecundação e de desenvolvimento embrionário *in vitro*, o que pode ser decorrente de falhas na maturação nuclear e citoplasmática ou da falta de sincronia desses dois eventos (RIZOS, *et al.*, 2002b; COGNIE, *et al.*, 2003).

Trabalhos do nosso grupo também demonstraram o impacto da maturação *in vitro* sobre a produção de embriões bovinos. Gomes (2010) maturou ovócitos bovinos na presença de *wortmannin*, um inibidor da enzima fosfatidil-inositol 3 quinase (PI3K), conseguindo aumentar significativamente a taxa de produção de blastocistos.

Diferentes vias de sinalização estão envolvidas na regulação da maturação ovocitária em mamíferos. As vias do fator promotor da maturação (MPF) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) constituem as principais vias de controle da maturação do oócito (UZBEKOVA *et al.*, 2009).

O processo de inibição/ativação dessas enzimas é eficientemente controlado por proteínas quinases e fosfatases, as quais modulam as vias celulares por eventos de fosforilação e defosforilação. A enzima fosfatidil-inositol 3 quinase (PI3K) atua de forma decisiva sobre a maturação do ovócito por meio da ativação da proteína quinase B (PKB), que por sua vez ativa a enzima fosfodiesterase 3 (PDE3), a qual promove a redução dos níveis de AMPc intra-ovocitários, permitindo assim a ativação do MPF, o que resulta na retomada da meiose (SCHMITT e NEBREDA, 2002).

O controle da atividade da PI3K pode ser feito pela utilização de inibidores de quinases nos meios de maturação *in vitro*, como o *wortmannin*, um inibidor específico covalente dessa enzima.

Nesse contexto o presente trabalho objetivou determinar o efeito do *wortmannin* (inibidor da PI3K) sobre a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos durante a maturação *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do *wortmannin* (inibidor da PI3K) sobre a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos durante a maturação *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a atividade da PI3K em oócitos maturados *in vitro* na presença de *wortmannin*;

Avaliar o efeito do inibidor da PI3K sobre a concentração de glicogênio dos oócitos após a MIV;

Determinar o efeito do *wortmannin* sobre os padrões de distribuição de componentes do citoesqueleto como actina e tubulina e de algumas organelas como grânulos corticais e mitocôndrias;

Avaliar a capacidade de desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro* a partir de ovócitos maturados na presença do inibidor da PI3K.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FOLICULOGÊNESE E OOGÊNESE

A foliculogênese corresponde ao processo de formação, crescimento (por aumento do diâmetro oocitário, multiplicação das células da granulosa e desenvolvimento do antro) e maturação folicular. Esse processo tem início com a formação do folículo primordial e culmina com o estágio conhecido como folículo de *De Graaf* ou pré-ovulatório (ANDRADE *et al*, 2005; FERNANDES *et al.*, 2009).

O folículo é a unidade morfofuncional do ovário mamífero e apresenta uma dupla função: proporcionar um ambiente ideal para o crescimento e a maturação do oócito e produzir substâncias, principalmente esteroides, além de diferentes peptídeos (FORTUNE *et al.*, 2000).

O oócito desempenha um papel muito ativo na promoção e crescimento do folículo, e orienta a diferenciação de células da granulosa mesmo na fase pré-antral (GILCHRIST *et al*, 2004).

A oogênese pode ser definida como o desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais da fêmea durante a vida embrionária, culminando com a formação do oócito haploide apto para a fecundação nos folículos pré-ovulatórios. (WANDJI *et al*, 1992; FERNANDES *et al*, 2009).

O oócito requer um processo de maturação para atingir o estágio onde será capaz de ser fecundado e iniciar o seu desenvolvimento. Tal processo compreende duas etapas principais: a maturação nuclear, que envolve dois ciclos meióticos, quando a vesícula germinativa progride do estágio de prófase da primeira meiose até a metáfase da segunda divisão meiótica, e a maturação citoplasmática, que compreende mudanças no posicionamento de organelas (THIBAUT e SZOLLOSI, 1987; HYTTEL, 1997; YAMADA e ISAJI, 2011).

Nos mamíferos, em geral, pode-se dividir a oogênese em duas etapas básicas, a primeira desenvolve-se durante a vida intrauterina do indivíduo e a segunda acontece após a puberdade. Na fase embrionária as células germinativas primordiais, com número diploide de cromossomos ($2n$) se dividem múltiplas vezes

por mitose até antes do nascimento (mulher, vaca, ovelha e cabra) ou em outras espécies, alguns dias após o nascimento (porca, gata e coelha), dando origem às oogônias ($2n$) (ARAUJO *et al*, 2007).

Esses gametas iniciam a meiose que vai parar no estágio de diplóteno da prófase I. Nesse momento a célula é um oócito primário identificado morfológicamente pela visualização da vesícula germinativa, e número diploide de cromossomos, que vai permanecer em quiescência até a puberdade (ARAUJO *et al*, 2007)

Após a puberdade, o oócito primário vai retomar a meiose até atingir a metáfase II, formando então um oócito secundário (n) e um corpúsculo polar (n). A meiose só será concluída se houver a fertilização (ARAUJO *et al.*, 2007).

Os ovários dos mamíferos contêm milhares de ovócitos inclusos em folículos ovarianos (antrais e pré-antrais). Os folículos pré-antrais representam cerca de 90% da população folicular e são responsáveis pela constante renovação de folículos antrais no ovário. No entanto, cerca de 99,9% dos folículos de um ovário não ovulam, param de desenvolver por um processo fisiológico conhecido como atresia (ANDRADE *et al.*, 2005).

3.2 CICLO CELULAR

O ciclo celular das células eucarióticas está dividido em quatro fases: M (mitose), G_1 (período entre a mitose e iniciação da replicação do DNA nuclear), S (período de replicação do DNA), G_2 (período entre a replicação completa do DNA e a mitose). A regulação do ciclo é crítica para o desenvolvimento normal de organismos multicelulares. A perda do controle desse processo pode desencadear patologias como o câncer. O maior conhecimento do ciclo celular permitiu que animais clonados fossem produzidos a partir de células diferenciadas e cultivadas *in vitro* (CAMPBELL *et al*, 1996; WILMUT *et al*, 1997; LODISH *et al.*, 2000).

3.2.1 Ciclo mitótico

Os maiores processos comuns a todos os ciclos celulares são as fases “S” (síntese), quando se replicam os cromossomos e a fase “M” (mitose ou citocinese), quando os cromossomos replicados são divididos em duas células filhas. O intervalo entre as fases “S” e “M” é chamado de “G2” (*Gap 2* ou intervalo). Em muitos casos, existe um intervalo de tempo entre a fase “M” e a próxima fase “S”, denominado “G1”, no qual algumas células podem parar o processo de divisão e entrar em uma fase chamada G0, (Figura 1) (DOREE, *et al* 2002).

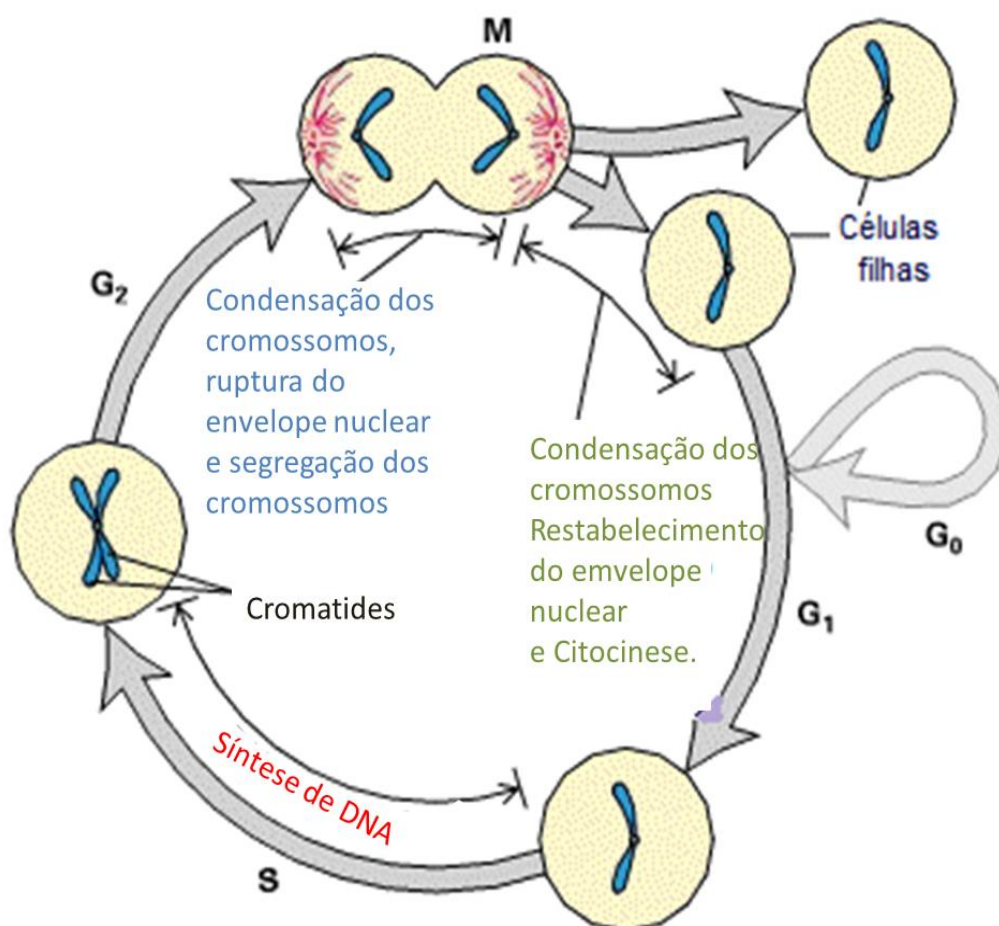


Figura 1. Representação esquemática do ciclo celular. Adaptado de LODISH *et al*, 2000.

As fases G1, S e G2 são consideradas como interfase, onde o envelope nuclear está presente e os cromossomos aparecem condensados. É na interfase que acontece a síntese de RNAs mensageiros (mRNA), síntese proteica e o aumento do tamanho da célula, a qual desta maneira pode entrar na fase M (LODISH *et al*, 2000).

Depois da citocinese, a célula pode continuar a divisão, avançando então até a fase G1, ou parar sua proliferação. Os parâmetros bioquímicos das células que entram em “quiescência” (G0) ainda estão pobremente entendidos (MALUMBRES *et al*, 2005).

O ciclo celular apresenta vários *check points* e o progresso entre as suas fases é controlado por quinases dependentes de ciclinas (CDKs), cuja atividade varia segundo o progresso do ciclo, levando a mudanças cíclicas na fosforilação das proteínas intracelulares que iniciam ou regulam os principais eventos do ciclo celular (ALBERTS *et al*, 2004).

3.2.2 Ciclo meiótico

A meiose é um tipo especial de divisão celular que ocorre nas células germinativas durante a formação de gametas e que promove a redução do número de cromossomos. É um processo similar à mitose, porém, envolve duas divisões celulares consecutivas (meiose I e meiose II), com apenas uma etapa de replicação. Na prófase da meiose I ocorre a recombinação cromossômica ou *crossing over*, que garante a diversidade genética entre as células produzidas. A segunda etapa (meiose II) é equacional, ou seja, ocorre sem que haja a fase S, ocorrendo assim uma diminuição no número de cromátides de cada cromossomo (ALBERTS *et al*, 2004). Várias proteínas quinase encontram-se envolvidas no processo de regulação meiótica.

3.3 REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR

3.3.1 Fator promotor da fase M (MPF)

O Fator Promotor da Fase M atua em células somáticas durante a mitose e nos gametas durante a meiose promovendo a quebra do envelope nuclear, induzindo a condensação da cromatina e participando da formação do fuso meiótico (MADGWICK *et al*, 2007). MPF é uma serina/ treonina-quinase da classe das quinases dependentes de ciclina (Cdks), também chamado de complexo Cdk1/Ciclina B. Sua forma ativa é composta de uma subunidade catalítica (Cdk1 ou p34cdc2 quinase) e outra regulatória (ciclina B1). Esta última é instável, sendo constantemente degradada e sintetizada, convertendo-se na responsável pelo controle fino da atividade do MPF (Figura 2) (WILLIAMS, 2002).

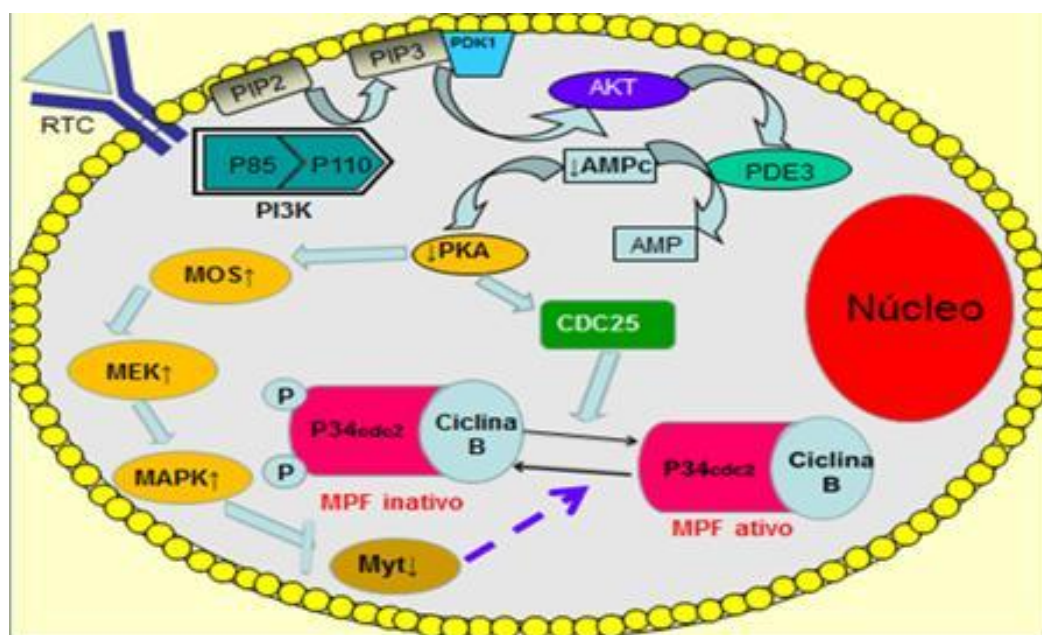


Figura 2. Esquema demonstrativo do processo de ativação do Fator Promotor da Maturação. AMPc: adenosina monofosfato cíclica; PKA: proteína quinase A; Mos: proteína do pro-oncogene *c-mos*; MEK: específico MAP-Quinase; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; myt 1: quinase; Thr 14/Tyr 15: resíduos da subunidade *cdc25*; P34cdc2: proteína Quinase; MPF: fator promotor de maturação e Cdc25: fosfatase de dupla especificidade (Adaptado de: VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

A Cdk1 regula o ciclo celular através da fosforilação de componentes celulares como a histona H1, induzindo assim a condensação da cromatina (MEINECKE *et al.*, 2001). No citoesqueleto o MPF atua fosforilando os filamentos intermediários, desestabilizando a lâmina nuclear e induzindo o rompimento do envelope nuclear (DESSEV *et al.*, 1991).

A ciclina B1 é degradada pela ação do “complexo promotor de anáfase/ciclossomo” (APC/ C), sendo que sua degradação é o que determina o aumento na atividade do MPF. A atividade APC/ C aumenta na presença de Ca^{+2} . (MADWICK *et al.*, 2007).

O mRNA da ciclina B1 é armazenado com uma pequena cauda de poli(A), o que inativa sua tradução. O acúmulo deste transcrito leva a uma poliadenilação citoplasmática extensa e subsequente tradução e síntese da proteína ciclina B, que se acumula e pode ser detectada no citoplasma do oócito três horas após o início da maturação *in vitro* (LEVESQUE *et al.*, 1996; JONES, 2004; TREMBLAY *et al.*, 2005).

Em oócitos bovinos tem sido observado que o elemento de poliadenilação citoplasmática ligado a proteínas (CPEB) e a Aurora-A são sintetizados e acumulados no citoplasma durante a maturação oocitária. CPEB fica unido a uma sequência específica de RNA reprimindo-a. Desta forma, a via de fosforilação Aurora-A-CPEB leva à poliadenilação e conseqüentemente à tradução da proteína p34cdc2 unida a ciclina B1. Esse complexo fosforilado leva a formação do chamado pré-MPF, que depois de sua fosforilação fica ativado, iniciando sua atividade (SASAYAMA *et al.*, 2005).

3.3.2 Proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK)

A proteína-quinase ativada por mitógeno participa na regulação da meiose, que juntamente com o MPF desempenha um papel importante na transição de meiose I para meiose II; e durante a manutenção da metáfase II até a fecundação. A MAPK é ativada por fosforilação durante a maturação do oócito e está envolvida na organização dos microtúbulos (MOTLIK *et al.*, 1998).

A MAPK é ativada por sinais extracelulares específicos como fatores de crescimento que pertencem a diferentes vias de sinalização. Por exemplo, MAPK é ativada por fosforilação promovida pela proteína-quinase Mos, produto do proto-oncogene *c-mos*.

Muitas das proteínas e dos fatores envolvidos no processo de retomada da meiose são sintetizados durante as primeiras horas do cultivo *in vitro*, tendo o MPF como um dos responsáveis da retomada da meiose. O mRNA da ciclina B1 pode ser detectado em oócitos bovinos em estágio de vesícula germinativa (GV), mas a respectiva proteína ainda não está presente nesse momento.

A proteína Mos também é codificada pelo mRNA materno armazenado durante o período de maturação. Essa proteína ativa a cascata da MAPK, a qual modula a atividade do MPF (Figura 3) levando a célula a entrar no ciclo celular (transição da fase G2 para a fase M).

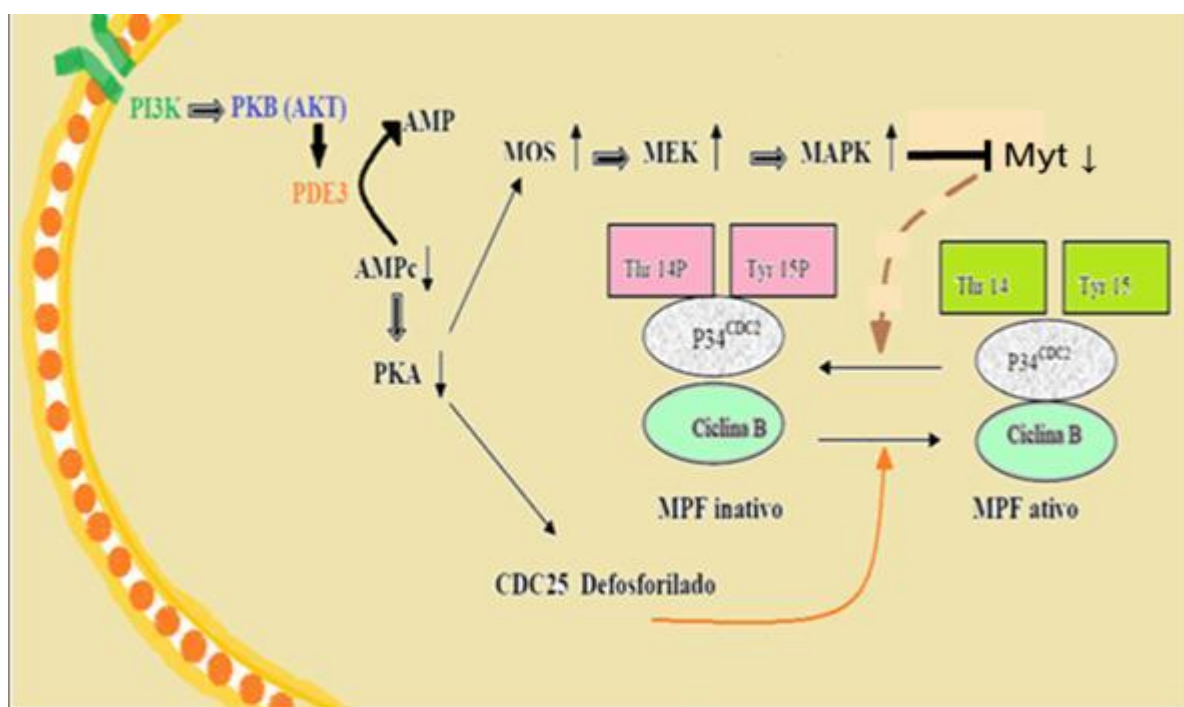


Figura 3. Esquema demonstrativo da participação da MAPK no processo de ativação do MPF. PI3K: fosfatidilinositol3 quinase, PKB/AKT: proteína quinase B, PDE3: fosfodiesterase 3, AMPc: adenosina monofosfato cíclico, PKA: proteína quinase A, Mos: proteína do pro-oncogene *c-mos*, MEK: específica MAP-Kinase, MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno, myt1: fator de transcrição de mielina 1, Thr14/Tyr15: treonina e tirosina resíduos da proteína P34 CDC2, MPF: fator promotor da maturação (Adaptado de: VAN DER HURK e ZHAO, 2005).

Nos complexos *cumulus oophorus* (CCOs) bovinos a poliadenilação dos mRNAs de proteínas que codificam para ativação do MPF e MAPK ocorre entre 9 e 12 horas do cultivo *in vitro*. A apropriada síntese e o armazenamento destes transcritos no citoplasma do oócito são de crucial importância para a continuidade da retomada da meiose (FERREIRA *et al.*, 2009).

Em resumo pode-se dizer que a maturação oocitária, evento indispensável para que o oócito adquira a competência para ser fertilizado, envolve a ativação de várias vias de sinalização que convergem para a ativação do MPF (Figura 3), atividade chave no processo de retomada da meiose (SCHMITT e NEBREDA, 2002).

3.3.3 Via da PI3K/AKT

A cascata da via da PI3K/AKT é desencadeada pela ativação de receptores tirosina quinase (RTC) localizados na membrana plasmática, os quais podem ser ativados por diferentes moléculas, entre elas a insulina e alguns fatores de crescimento. A ativação desses receptores resulta em sua autofosforilação. O resíduo de fosfotirosina (pY) do receptor interage com o domínio da proteína ligadora da fosfotirosina (PTB), da proteína substrato do receptor de insulina 1 e 2 (IRS 1 e 2), recrutando-as para a membrana plasmática onde serão fosforiladas. Como resultado, IRS 1 e 2 interagem com o domínio homólogo-Src-2 (SH2) da subunidade p85 da PI3K. O recrutamento da PI3K na membrana plasmática, permite que a subunidade catalítica p110 catalise a formação de fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato (PtdIns(3,4,5)P3/PIP3) a partir de fosfatidil inositol-4,5-difosfato (PtdIns(4,5)P2/PIP2) (BAUDLER *et al.*, 2005).

PIP3 em união com o domínio homólogo a Pleckstrina (PH) das proteínas quinases dependentes de fosfatidilinositol-1 (PDK1) e proteína quinase B (PKB/AKT), colocalizam-se na membrana plasmática permitindo que PDK1 ative PKB/AKT, que por sua vez fosforila e inibe a enzima glicogênio sintase-3 GSK-3, produzindo desfosforilação dos substratos da GSK3, incluindo a glicogênio sintase

(GS) e o fator iniciador eucariótico 2B (eIF2B). Isso contribui para estimular a síntese de proteínas e glicogênio induzidos por insulina (Figura 4) (FRAME e COHEN, 2001 a,b).

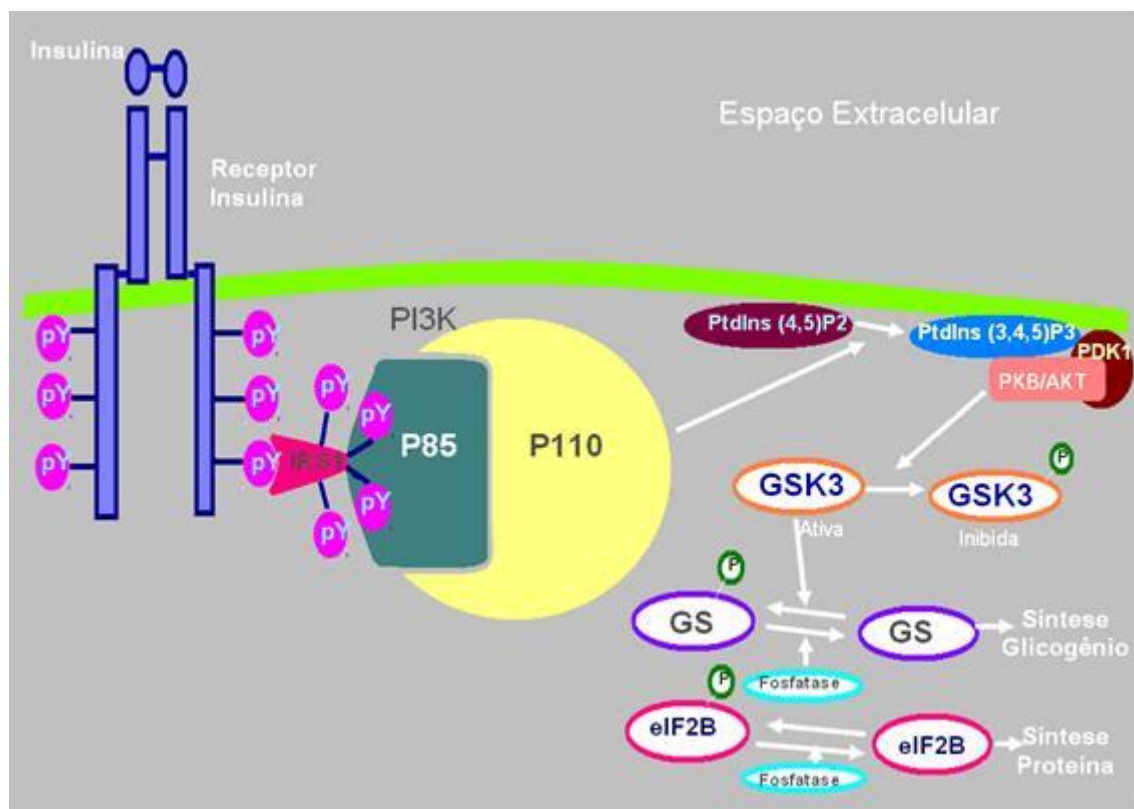


Figura 4. Via da sinalização pela qual a insulina ativa a PI3K e inibe a GSK-3 contribuindo para estimulação da síntese de glicogênio e proteínas (Adaptado de Cohen e Frame, 2001).

3.4 MATURAÇÃO *IN VITRO* DOS OÓCITOS

A produção de embriões *in vitro* baseia-se essencialmente na obtenção de oócitos dos folículos ovarianos, maturação *in vitro* mediante um meio ambiente e estímulos hormonais adequados, além da fecundação *in vitro* e do cultivo dos embriões obtidos até fases de desenvolvimento adequadas para sua transferência ou congelamento (VARAGO et al., 2008).

Na espécie bovina a produção *in vitro* de embriões alcançou um desenvolvimento tecnológico que atualmente permite a sua aplicação em escala comercial, podendo-se obter entre 50 a 100 embriões/fêmea/ano. Considerando que

com a transferência de embriões produzidos *in vitro* é possível alcançar uma taxa de prenhez de 50%, podem ser obtidos entre 25 e 50 bezerros/vaca/ano, o que supera a eficiência da metodologia convencional de transferência de embriões (TE), com custos inferiores (VARAGO *et al.*, 2008).

A inadequada maturação do oócito reduz as taxas de fecundação e de desenvolvimento embrionário, o que pode ser decorrente de falha na maturação nuclear e citoplasmática (RIZOS *et al.*, 2002a; COGNIE *et al.*, 2003).

A aquisição de competências de desenvolvimento acontece continuamente durante a foliculogênese, sendo influenciada *in vivo* pelo tamanho folicular e pela atresia. Já na PIV, aceitando a natureza heterogênea dos oócitos imaturos utilizados, a maturação oocitária pode ser influenciada principalmente pelas condições e os componentes dos meios de cultura (COGNIE *et al.*, 2003).

A maturação oocitária *in vitro* é induzida por hormônios específicos (FSH, LH, estradiol) envolvendo a ativação de vias de transdução de sinais específicas que convergem para ativar o MPF, o qual é a chave da atividade que catalisa a entrada na fase-M da meiose I e meiose II (SCHMITT *et al.*, 2002; MADGWICK e JONES, 2007).

Os oócitos que atingem o crescimento total permanecem parados na prófase (diplóteno) da primeira meiose. As etapas da maturação meiótica nos oócitos dos vertebrados são: (1) retomada da meiose I incluindo a quebra da vesícula germinativa, condensação dos cromossomos e formação do fuso; (2) transição entre meiose I e meiose II incluindo a inibição da fase-S e (3) parada na metáfase II pela atividade do fator citostático (CSF). A meiose II é completada após a fertilização do oócito maduro (SCHMITT, *et al.*, 2002).

Para induzir a maturação nuclear e citoplasmática, além dos hormônios devem ser adicionados ao meio, cisteamina, glutamina, piruvato de sódio, soro de fêmea em estro, soro fetal (FCS) ou fluido folicular de folículos não atrésicos, além de submeter os CCOs a condições ambientais adequadas como a tensão de CO₂, O₂, temperatura, umidade e tempo de maturação nuclear *in vitro* (COGNIÉ *et al.*, 2003; COGNIÉ *et al.*, 2004).

A obesidade, o elevado nível de insulina ou a resistência à insulina estão associados com infertilidade nas mulheres, mas ainda não se conhece os mecanismos que ligam a desregulação metabólica com a fertilidade. Oócitos de

mamíferos ou folículos em crescimento expostos a elevados níveis de insulina apresentam comprometimento na sua capacidade de desenvolvimento (ACEVEDO, 2007). Acredita-se que a insulina regula o desenvolvimento das competências oocitárias pela via da glicogênio sintase-quinase-3 (GSK-3). Assim, a elevação da concentração de insulina influencia negativamente a fertilidade, pela desregulação da GSK-3 oocitária, levando a segregação anormal da cromatina durante os eventos da clivagem inicial (ACEVEDO, 2007).

3.4.1 Maturação nuclear

A maturação nuclear refere-se à habilidade do núcleo em retomar a meiose, ou seja, chegar ao estágio de metáfase da segunda divisão meiótica, o que pode ser observado por microscopia através da extrusão do primeiro corpúsculo polar (MERMILLOD *et al.*, 1996, CROZET, 1997). No intervalo que compreende os estádios de prófase I à metáfase II, os cromossomos se condensam e o envelope nuclear é desfeito (GVBD), marcando o início da maturação nuclear (MEINECKE *et al.*, 2001).

O objetivo da maturação nuclear é a obtenção de um gameta haploide de dois ciclos de divisão celular meiótica. A competência meiótica inicia-se durante a formação do antro, porém o oócito permanece na prófase I até o pico de LH. A retomada da meiose é induzida *in vivo* pelo pico de LH ou quando os oócitos são removidos do ambiente folicular e colocados em meios de maturação *in vitro* (BEVERS *et al.*, 1997; MEHLMANN, 2005).

O LH atua via receptores localizados nas células da granulosa afetando de forma indireta a maturação do oócito. A retomada da meiose caracteriza-se pela quebra da vesícula germinativa seguida de condensação dos cromossomos e formação do fuso da metáfase I (MI). Esta primeira divisão meiótica se completa com a segregação de cromossomos homólogos entre o oócito e o primeiro corpúsculo polar, levando o oócito à metáfase II (MII), onde permanece até a fecundação (DEKEL, 2005).

3.4.2 Maturação citoplasmática

A maturação citoplasmática não pode ser identificada somente pela organização de suas organelas, mas também em níveis moleculares (DURANTHON e RENARD, 2001; MERMILLOD *et al.*, 2008).

O processo de maturação citoplasmática pode ser dividido em três principais eventos: a redistribuição de organelas citoplasmáticas, a movimentação de filamentos do citoesqueleto e a maturação molecular (MAXIMO, 2009).

3.4.2.1 Redistribuição de organelas

O tráfego de organelas durante a maturação ocorre através da atuação de microfilamentos e microtúbulos do citoesqueleto e o reposicionamento das organelas depende das necessidades da célula durante cada estágio de desenvolvimento (FERREIRA *et al.*, 2009).

Para a maturação citoplasmática são indispensáveis a fosforilação e a síntese de proteínas envolvidas na atividade metabólica. As mitocôndrias são muito importantes, por serem componentes chave para o suprimento da energia necessária no processo de maturação. O movimento destas organelas para áreas de alto consumo de energia é crucial para os oócitos e blastocistos em períodos críticos do ciclo celular. Durante a maturação as mitocôndrias sintetizam o ATP necessário para a síntese de proteínas que vão suportar a maturação e o desenvolvimento embrionário (STOJKOVIC *et al.*, 2001).

A ultraestrutura de oócitos bovinos maturados *in vivo* mostra uma distribuição periférica das mitocôndrias. Próximo ao surgimento do pico de LH elas se agrupam no estágio final de maturação nuclear, e se dispersam novamente após a extrusão do corpúsculo polar. Ao atingir a MII, as mitocôndrias, junto com as gotas lipídicas, estão centralizadas nas células (HYTTEL *et al.*, 1997).

Tanto para a maturação citoplasmática quanto para a formação do zigoto e o desenvolvimento embrionário inicial é de vital importância a síntese de proteínas.

Para este fim, uma quantidade apropriada de ribossomos deve estar presente durante a maturação. Estes são sintetizados pela transcrição de genes de RNA ribossômico (RNAr), pelo processo de transcrição e adição de proteínas ribossomais às suas subunidades. Essas subunidades são formadas nos nucléolos e durante as fases de crescimento dos oócitos e ativação do genoma embrionário ele está presente na forma fibrinogranular, refletindo a alta atividade de síntese ribossomal. No caso dos folículos primordiais o oócito possui atividade transcricional quiescente pelo que o nucléolo só está composto pela porção granular, sinalizando ausência da atividade de síntese ribossomal (FAIR *et al.*, 2001; FAIR *et al.*, 2004).

A presença de ribossomos, então, é diretamente ligada à síntese proteica durante períodos cruciais de desenvolvimento (TOMEK *et al.*, 2002).

As membranas do retículo endoplasmático são fisiologicamente ativas, interagem com o citoesqueleto e contêm diferentes domínios especializados em funções diversas. Algumas dessas funções são a formação e a degradação proteica, o metabolismo lipídico, a compartimentalização do núcleo, a regulação do gradiente iônico de cálcio e a síntese de membranas (LIPPINCOTT-SCHWARTZ *et al.*, 2000).

Mudanças bioquímicas e estruturais no retículo durante a maturação são críticas para um funcionamento apropriado da regulação intracelular do cálcio. Em oócitos de mamíferos o retículo é encontrado em regiões corticais e se acumula em pequenos aglomerados no citoplasma durante seu desenvolvimento até a metáfase II e a liberação de cálcio é aumentada depois da maturação, também durante a fertilização o retículo libera cálcio como resposta à entrada do espermatozoide no oócito, dando início ao desenvolvimento embrionário (STRICKER, 2006).

Outra organela importante no processo de maturação oocitária são os grânulos corticais, os quais são derivados do complexo de Golgi e sua exocitose é um dos mecanismos para evitar a polispermia (Figura 5). Estes grânulos encontram-se exclusivamente no oócito, sendo compostos por proteínas, moléculas estruturais, enzimas e glicosaminoglicanos. Para oócitos no estado de vesícula germinativa, os grânulos estão distribuídos em grupos no citoplasma. No final da maturação, quando os oócitos atingem a metáfase II, os grânulos corticais se posicionam em contato íntimo com a membrana plasmática, como forma estratégica de bloqueio da polispermia (THIBAUT *et al.*, 1987).

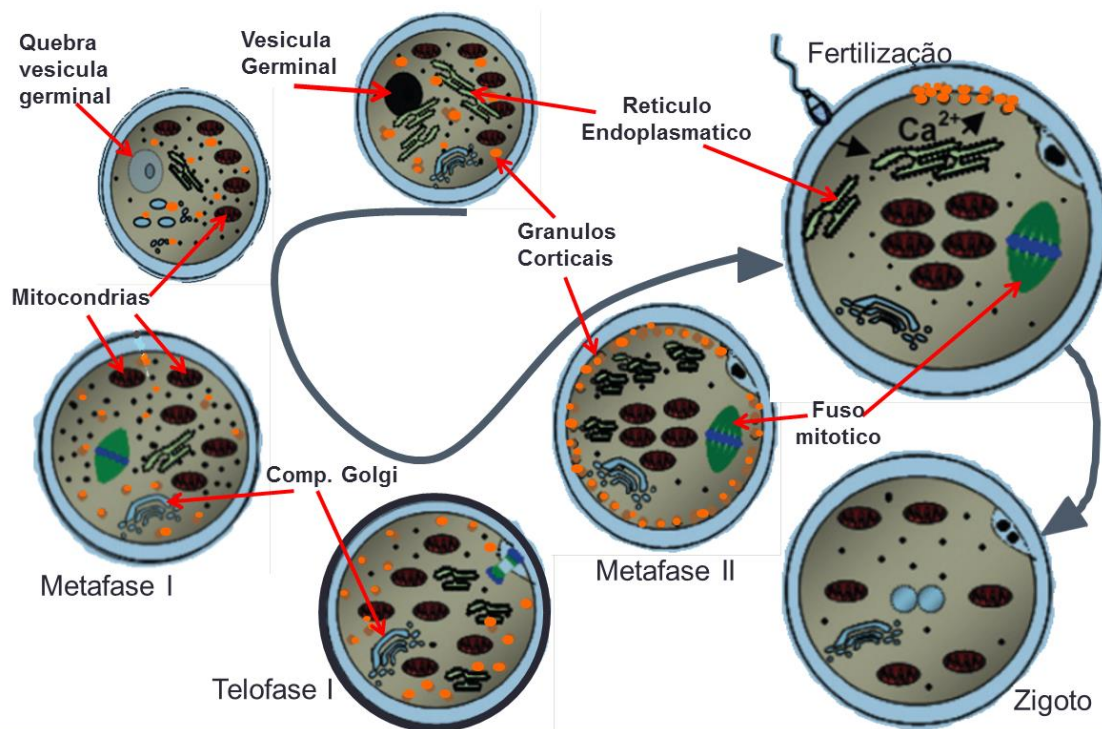


Figura 5. Progressão da maturação nuclear e movimentação das organelas citoplasmáticas desde o estágio de vesícula germinativa, até a metáfase II e a formação do zigoto. Distribuição de organelas e liberação do conteúdo dos grânulos corticais, secundário à liberação intracelular de Ca^{2+} depois da entrada do espermatozoide no oócito durante a fertilização. (Adaptado de: FERREIRA *et al.*, 2009)

Todos os eventos mencionados na maturação oocitária são dependentes do metabolismo energético da célula, em particular da resposta metabólica à insulina mediada primariamente pela enzima PI3K e posteriormente pela GSK3, que regula tanto a síntese de glicogênio quanto a de proteínas. A insulina, assim como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), promovem o desenvolvimento embrionário. O receptor para IGF-I é expresso a partir do estágio de mórula (SALUTE *et al.*, 1992; HERLER *et al.*, 1998) (Figura 5).

O piruvato constitui-se no substrato preferido do oócito na ausência de células somáticas depois da ovulação, visto que pouca glicose é utilizada pelo oócito nesse período, sendo assim temporalmente dependente das células do *cumulus* para metabolizar a glicose para intermediários tais como o piruvato (KHURANA e NIEMANN, 2000; SUTTON *et al.*, 2003).

3.4.2.2 Movimentação de filamentos do citoesqueleto

A dinâmica dos microtúbulos precisa ser perfeitamente controlada durante a meiose, a fim de produzir um fuso capaz de segregar, com sucesso, os cromossomos. Quando as células entram em divisão o crescimento dos microtúbulos desde os centrossomos se incrementa drasticamente. No rápido crescimento e encurtamento os microtúbulos são atraídos e estabilizados pelos cromossomos, permitindo a formação de um fuso mitótico bipolar. Estas alterações na dinâmica dos microtúbulos ocorrem concomitantemente com a fosforilação de muitas proteínas, por meio da ativação de uma série de quinases, tais como cdc2 quinase, polo quinase e aurora quinase (WAKEFIELD *et al.*, 2003).

Os filamentos do citoesqueleto são estruturas dinâmicas e adaptáveis que podem mudar ou permanecer imóveis segundo a necessidade da célula. Além disso, este sistema é responsável pela segregação dos cromossomos durante a mitose e meiose, pela divisão celular durante a citocinese e pelo tráfego de moléculas e organelas dentro da célula (ALBERTS *et al.*, 2004).

Os três tipos de filamento do citoesqueleto são os microtúbulos, filamentos de actina e filamentos intermediários. Dentre estes tipos de filamentos os microtúbulos são os mais diretamente envolvidos no processo de movimentação das organelas (SUN *et al.*, 2006). As subunidades do microtúbulo se aderem com proteínas motoras como a dineína, dinactina e kinesina, as quais se ligam a moléculas das membranas das organelas promovendo o movimento ao longo dos microtúbulos (STEFFEN *et al.*, 1997).

A dinâmica dos filamentos do citoesqueleto está relacionada com a aquisição das competências de desenvolvimento nuclear em oócitos de bovinos e suínos (ALBARRACIN *et al.*, 2005).

3.4.3 Maturação molecular

A maturação molecular refere-se às fases de crescimento e maturação do oócito envolvendo a transcrição, o armazenamento e o processamento dos mRNAs, que podem posteriormente ser traduzidos pelos ribossomos como proteínas. As proteínas derivadas destes mRNAs estão envolvidas na maturação e subsequentes eventos celulares tais como fertilização, formação de pró-núcleos e embriogênese inicial (SCHMITT e NEBREDA, 2002).

Múltiplos mecanismos estão envolvidos na ativação da tradução do mRNA inativo. Tais mecanismos envolvem a fosforilação de muitos fatores que iniciam a tradução (como eIF04F) a fosforilação da proteína S6 sobre a subunidade ribossomal 40S e a desfosforilação de poli (A)- polimerase, só para citar um exemplo. De acordo com esse modelo, a poliadenilação (adição de adenina) da porção terminal 3' do mRNA citoplasmático pode estimular a liberação de moléculas repressoras ligadas a porção 5', iniciando assim a tradução (THACH, 1992; COLGAN *et al.*, 1996; GAVIN *et al.*, 1997).

Este processo de poliadenilação inicia no núcleo, e 250 a 300 resíduos de adenina (A) são aderidos ao mRNA para a formação da cauda 3' poli(A). O transporte deste mRNA para o citoplasma ocorre através de uma junção característica da cauda poli(A) que, depois de atingir o compartimento citoplasmático, torna-se menor e mais heterogêneo em tamanho (JACKSON *et al.*, 1990; MERIC, *et al.*, 1996).

Quando as moléculas de mRNA têm caudas de poli(A) curtas não são traduzidas efetivamente e a supressão desta sequência é um passo inicial no processo de degradação. O prolongamento no citoplasma da cauda de poli(A) está relacionado com a ativação da tradução, ou seja, que a adição de adenina ao mRNA no citoplasma oocitário durante a maturação leva à tradução de proteínas e deadenilação, o que por sua vez leva à degradação do mRNA particular (SHIM *et al.*, 1997).

Quando comparada a qualidade dos embriões de clivagem inicial (embriões que clivaram até as 27 horas após inseminação) com embriões com baixo desenvolvimento potencial (clivagem após 27 horas) foram observadas várias

diferenças nos padrões de poliadenilação do mRNA, concluindo que essas mudanças estão associadas à modulação da expressão de genes nos embriões durante esta fase. Além disso, concluiu-se também que níveis anormais de poliadenilação em alguns mRNAs maternos estão associados com menor potencial de desenvolvimento embrionário (BREVINI *et al.*, 2002).

3.5 FOSFATIDIL INOSITOL 3 QUINASE (PI3K)

A família de enzimas PI3K (fosfatidilinositol 3 quinase) regula diversas funções biológicas em cada tipo de células através da geração de segundos mensageiros lipídicos que, finalmente, resulta na mediação de atividades celulares tais como a proliferação, a diferenciação, a quimiotaxia, a sobrevivência, o tráfego e a homeostase da glicose (ZHENG e LIU, 2011).

Com base nas semelhanças estruturais, os membros da PI3K são subdivididos em três classes: classe I, II e III. As PI3K da classe I e II foram encontradas nos metazoários, enquanto as PI3K de classe III também são encontradas em eucariotos unicelulares. Hoje sabe-se que todas as classes já foram demonstradas em mamíferos e são estudados seus efeitos em múltiplas doenças de humanos (MEDINA-TATO *et al.*, 2007; WYMANN *et al.*, 2005).

As PI3K de classe I são subdivididas em dois grupos, IA e IB. As da classe IA são enzimas heterodiméricas constituídas por subunidades reguladoras (p85-Alfa, Beta, ou p85-p55-Gamma) e uma subunidade catalítica (p110-Alfa, Beta-p110 ou p110-Delta). Existe apenas uma subunidade catalítica e uma subunidade reguladora da classe IB, que são conhecidos como gama-p110 e p101, respectivamente. Cada uma das subunidades catalíticas pode se associar com todas as subunidades reguladoras (MEDINA-TATO *et al.*, 2007; WYMANN *et al.*, 2005).

PI3K de classe I catalisa a fosforilação da subunidade 3 da hidroxila dos fosfoinosítídeos. *In vitro*, todas as PI3K de classe I são capazes de fosforilar PtdIns / PI (fosfatidilinositol) para PtdIns (3) P, PtdIns (4) P / PIP (fosfatidilinositol-4-fosfato) para PtdIns (3,4) P₂ e PtdIns (4, 5) P₂/PIP₂ (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato) para PtdIns (3,4,5) P₃/PIP₃ (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato), com PIP₂ como o principal

substrato *in vivo* (MEDINA-TATO *et al.*, 2007; WYMAN *et al.*, 2005). Os termos PIP2 e PIP3 são usados para descrever o substrato e o produto das PI3K de classe I, respectivamente.

As PI3K de classe II são denominadas como PI3K C2 Alfa (fosfoinositideo 3-quiinase-classe 2 alfa Polipeptídeo), PI3K C2 Beta e PI3K C2 Gamma. Considerando que, PI3K de classe I residem principalmente no citoplasma, até serem recrutadas para ativar os complexos de sinalização, as PI3K de classe II são ampla e constitutivamente associadas com a estrutura da membrana, incluindo a membrana plasmática, as membranas intracelulares e surpreendentemente, com a membrana nuclear (VANHAESEBROECK *et al.*, 2013).

In vitro, as PI3K de classe II fosforilam PtdIns e PIP, mas, ao contrário das PI3Ks Classe I, não fosforilam PIP2. As PI3K de classe II não estão associadas com uma subunidade reguladora, mas elas possuem um amplo N-e C-terminais em relação as PI3K de classe I, que podem desempenhar esta função (VOIGT *et al.*, 2005).

A classe III de PI3K, PI3K C3 (fosfoinositideo 3-quinase-classe-3), preferencialmente fosforila PtdIns para produzir PtdIns (3) P, que recruta um grupo distinto de proteínas efetoras com os domínios Fyve ou Phox (PX). A subunidade catalítica forma um complexo com uma proteína quinase serina-treonina, PI3K (fosfoinositideo 3-quinase –peptídeo-4/ p150 subunidade regulatória (VOIGT *et al.*, 2005).

As PI3K de classe III apresentam uma importante função no tráfego intracelular. Estas enzimas, juntamente com as PI3K de classe II regulam vários aspectos do tráfego de vesículas e, como tal, encontram-se envolvidas em atividades como processamento de antígenos e respostas citotóxicas (VOIGT *et al.*, 2005).

3.5.1 Influência da PI3K na maturação oocitária

O progresso atual nas tecnologias permite indicar que a sinalização por PI3K materna pode regular a ativação do genoma embrionário (EGA) e a embriogênese

pré-implantacional, mas não pode regular a fertilização e a primeira clivagem no embrião (ZHENG *et al.*, 2010).

Observando a via de sinalização da PI3K pode-se evidenciar vários dos eventos que podem afetar, tanto a ativação do MPF e/ou da MAPK, quanto de proteínas como a G (Rac e Rho), que intervêm nas constantes associações e dissociações do citoesqueleto e, portanto atuam em eventos como a movimentação das mitocôndrias e dos grânulos corticais de igual maneira que a formação e o alinhamento do fuso meiótico (CHEN *et al.*, 2010).

Além das funções mencionadas é importante adicionar que a via de sinalização da PI3K/AKT afeta também o metabolismo energético dos oócitos, visto que algumas das enzimas desta via influenciam a síntese de glicogênio (GSK3), a captação e o transporte da glicose (AKT) e até podem estimular a glicólise (HILL *et al.*, 1999; RILEY *et al.*, 2006).

3.5.1.1 Regulação dos níveis de glicose e glicogênio

Durante as fases iniciais de clivagem de embriões humanos e de ratos, o piruvato e o lactato são as principais fontes de energia e, assim, representam importantes componentes de meios de cultura de embriões (LEESE *et al.*, 1993; KHATCHADOURIAN *et al.*, 1994; GOPICHANDRAN e LEESE, 2003).

A glicose é pouco utilizada nas fases iniciais de clivagem, e pode ser inútil ou mesmo tóxica para os embriões em cultura, mas torna-se essencial nas fases posteriores de desenvolvimento (LEESE e BARTON, 1984; LEESE *et al.*, 1993; GOPICHANDRAN e LEESE, 2003)

AKT demonstrou ter efeito na captação de glicose e por induzir a glicólise pela translocação de ambos os transportadores de glicose, GLUT1 e GLUT4, para a membrana plasmática (KAN *et al.*, 1994; HILL *et al.*, 1999; JENSEN *et al.*, 2006). Mais recentemente, as formas ativas de Akt foram apresentadas como estimuladoras da atividade da hexoquinase, primeira enzima da via glicolítica (GOTTLOB *et al.*, 2001; RATHMELL *et al.*, 2003).

Assim, em alguns tipos de células a via PI3K/Akt regula a glicólise, controlando tanto a entrada da glicose na célula através da translocação de transportadores de glicose na superfície da célula quanto através da regulação da atividade de enzimas envolvidas na via glicolítica (RILEY *et al.*, 2006).

3.5.1.2 Regulação da concentração intra-oocitária de AMPc

A diminuição da concentração de AMPc também está diretamente relacionada com a ativação do MPF. O AMPc originário das células foliculares alcança o oócito por meio das junções comunicantes, mantendo-se em alta concentração, via proteína quinase A (PKA). *In vivo* pelo pico pré-ovulatório de LH se induz a perda da comunicação entre as células foliculares e o oócito, promovendo a diminuição da concentração de AMPc intraoocitária levando a inativação da PKA, o que possibilita a reativação do MPF e conseqüentemente, da divisão celular (DEKEL, 2005).

O momento de ativação da MAPK durante a maturação do oócito varia em diferentes espécies, mas acredita-se que a atividade da MAPK é requerida para manutenção da atividade do MPF, formação do fuso meiótico e manutenção da parada na metáfase II (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

3.5.1.3 Remodelação do citoesqueleto e interação com as GTPases

Pesquisas realizadas por Gomes (2010) mostraram indícios da atividade da PI3K sobre a movimentação das organelas citoplasmáticas, durante a MIV. Por esta razão nossos experimentos foram direcionados a determinar a atividade da enzima na movimentação dos grânulos corticais, que determinam o grau de maturação alcançado pelo oócito.

PI3K, bem como as pequenas GTPases da família Ras estão entre os mais importantes componentes de sinalização precoce que mediam o crescimento celular, a proliferação, os rearranjos do citoesqueleto, a progressão do ciclo celular, a

movilidade celular, o tráfego intracelular de vesículas e a apoptose. Além de regular componentes como Raf, diferentes GTPases pequenas da família Ras podem interagir e ativar diretamente as PI3K de classe I através de um domínio de ligação Ras que está presente em todas as unidades catalíticas P110 da PI3K (PACOLD *et al.*, 2000; ENGELMAN *et al.*, 2006).

Estudos realizados em fibroblasto de camundongo mostraram que as células que expressam Rac constitutivamente ativa, tinham níveis elevados de PIP3, que pode ser reduzida por meio da inibição da polimerização de actina. Além disso, a maior parte das GTPases pequenas da família Rho são capazes de induzir ou alterar a polimerização de actina (HEO e MEYER, 2003).

No entanto, o papel das diferentes GTPases pequenas da família Rho com feedback positivo para ativação PI3K ainda não é compreendido totalmente. Estudos recentes têm mostrado que a ativação rápida de Rac endógeno desencadeia eficazmente a polimerização de actina, mas não consegue positivamente ativar PI3K (INOUE e MEYER, 2008).

Yang *et al.* (2012) propuseram que para gerar e manter uma ativação efetiva da PI3K, a célula requer uma regulação cooperativa entre as pequenas GTPases das famílias Ras e Rho em união com a PI3K (Figura 6).



Figura 6. Regulação cooperativa das pequenas GTPases das famílias Ras e Rho são essenciais para a efetiva ativação da PI3K (Adaptado de: WON YANG *et al.*, 2012)

O papel das pequenas GTPases Rac na regulação da PI3K não está ainda totalmente esclarecido. Muitos estudos mostraram que elas atuam em etapas após a PI3K enquanto outros têm sugerido que elas podem ser ativadoras da PI3K (Won Yang *et al.*, 2012).

Uma outra enzima pertencente à cascata da insulina, e portanto dependente da ativação da PI3K, é a glicogênio sintase quinase 3 (GSK3), uma proteína quinase serina/treonina com duas isoformas denominadas GSK3 α e GSK3 β (WANG *et al.*, 2003).

Pode-se afirmar que a GSK-3 regula a fosforilação de proteínas associadas com as cromátides, que dirigem a separação e segregação normal dos cromossomos homólogos. A inibição da GSK3 reduz a fosforilação das proteínas associadas aos microtúbulos resultando em polimerização anormal desse componente do citoesqueleto (WAKEFIELD *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2003).

Em células somáticas a GSK3 está presente ao longo do comprimento dos microtúbulos do fuso, aparecendo em forma fosforilada no centrossomo e nos polos do fuso. Mais ainda, a inibição da enzima utilizando cloreto de Lítio, SB216763 e SB415286, leva a um aumento no comprimento do fuso e alinhamento defeituoso dos cromossomos (WAKEFIELD *et al.*, 2003).

3.5.1.4 Interação com as GTPases

O aumento intracelular de cálcio, induzido pela ativação do receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3R) presente na membrana do retículo endoplasmático, também pode influenciar a ativação do oócito. A mobilização intracelular de cálcio é seguida por influxo de cálcio do ambiente extracelular, o qual parece ser regulado através da estimulação antagonista do LH ou da adenilato ciclase (AC) (WILLIAMS, 2002; TSAFRIRI e MOTOLA, 2007).

A retomada da meiose a partir da metáfase II ocorrerá logo após a fertilização, devido ao aumento dos níveis de cálcio, o que irá induzir a degradação da ciclina e, conseqüentemente, do MPF. Com o progresso da metáfase II ocorre a

divisão desigual do citoplasma e a liberação do segundo corpúsculo polar (WILLIAMS, 2002; TSAFRIRI e MOTOLA, 2007).

Estudos realizados em células de glândula lacrimal de ratos têm demonstrado que a ativação da MAPK é dependente de cálcio e PKC quando ativada a via de sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que inclui ativação do fator adaptador das proteínas Shc e Grb2, e a pequena proteína G Ras. (INAGAMI *et al.*, 2000; HODGES *et al.*, 2006).

3.5.1.5 Inibição da apoptose

Tem sido sugerido que a via de sinalização PI3K/AKT estimula o desenvolvimento do oócito, enquanto Foxo3a o inibe. O Foxo3a, substrato da AKT, é um fator transcricional que leva a apoptose e a parada do ciclo celular. Vale ressaltar que, além do Foxo3a, o Foxo1 e o Foxo4 também podem ser fosforilados pela via PI3K, resultando na inibição da apoptose e na ativação do ciclo celular (ACCILI e ARDEN, 2004).

A PI3K é uma enzima fundamental para a regulação da proliferação, da sobrevivência, da migração e do metabolismo celular, além de ter um importante papel na regulação da ativação de folículos primordiais (JOHN *et al.*, 2009). Dita regulação é provocada pelo fato da ativação da PI3K produzir fosforilação da Akt e do fator de transcrição Foxo3a (FKHRL1), resultando em ativação da Akt e supressão de Foxo3a (REDDY *et al.*, 2005)

Akt é uma molécula sinalizadora conhecida por aumentar a proliferação e a sobrevivência celular, bem como a síntese de glicogênio e proteínas (BLUME-JENSEN e HUNTER, 2001).

3.5.2 *Wortmannin* Inibidor químico da PI3K

Wortmannin é um metabólito, furano-esteroide, sintetizado pelo fungo *Penicillium funiculosum*, *Talaromyces (Penicillium) wortmannii*, que funciona como inibidor específico covalente da fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K). Ele tem uma concentração inibitória *in vitro* (IC₅₀) de 5 nM, sendo um inibidor mais potente do que LY294002, outro inibidor da PI3K usado comumente (www.fermentek.co.il/wortmannin.htm).

Wortmannin exibe uma potência semelhante *in vitro* para as PI3K de classes I, II e III, embora também possa inibir outras enzimas PI3K-mTOR relacionadas, tais como a DNA-PK, algumas fosfatidilinositol 4-quinases, a miosina quinase de cadeia leve (MLCK) e MAPK, quando em concentrações elevadas (FERBY *et al.*, 1996; VANHAESEBROEK *et al.*, 2001).

Wortmannin está classificado como um androstadieno, inibidor da fosfolipase D, solúvel em DMSO e metanol e instável em água e soluções etanoicas. Tem sido usado como imunossupressor e antifúngico e principalmente como inibidor da fosfatidil inositol 3 quinase. Também é capaz de inibir o crescimento de tumores mamários e inibir o reparo da dupla cadeia do DNA em células irradiadas normais em humanos. Sua fórmula molecular e estrutura estão representadas na figura 7 (www.fermentek.co.il/wortmannin.htm).

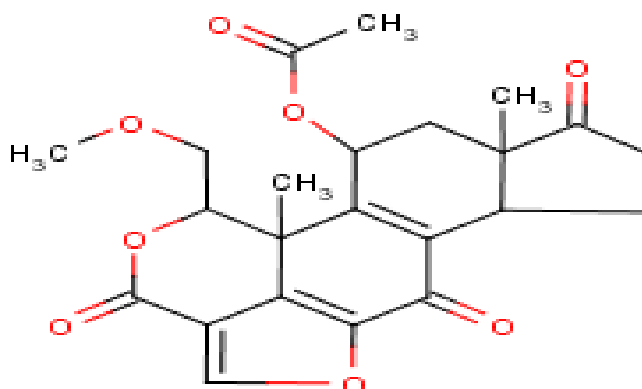


Figura 7. Formula estrutural do *wortmannin* correspondente à fórmula química C₂₃H₂₄O₈.

A análise cinética demonstra que o *wortmannin* é um inibidor não-competitivo, irreversível da PI3K, com inativação dependente da concentração e do tempo (POWIS et al., 1994).

Wortmannin também foi relacionado com a inibição dos membros da família polo-quinase com IC50 na mesma faixa de PI3K (LIU et al., 2007).

Anas et al., (2000) demonstraram que o *wortmannin* impediu o desenvolvimento de oócitos bovinos além da MI, mas não afetou a quebra da vesícula germinativa (GBVD) e postularam que este inibidor pode fazer uma modulação da duração dos eventos envolvidos na GBVD como condensação da cromatina, e a desintegração da membrana nuclear.

A atividade do MPF nos oócitos de mamíferos foi estudada, determinando-se os níveis de atividade da sua subunidade CDC2 quinase. Foram observados dois picos de atividade durante a MIV, um às 12 h e outro às 20 h, o que coincide com os tempos para se atingir a MI e MII, respectivamente, sendo normal apresentar uma queda transitória entre os dois picos (SIRARD et al., 1989).

Baseado no fato de que os oócitos maturados em presença do *wortmannin* não apresentaram queda na atividade do MPF entre a MI e MII (Figura 8), ANAS et al.(2000) postularam que a PI3K possui atividade regulatória sobre CDC2 quinase, uma vez que sua inibição inibe o declínio normal da atividade da CDC2 quinase entre às 12 e 24 h de maturação in vitro.

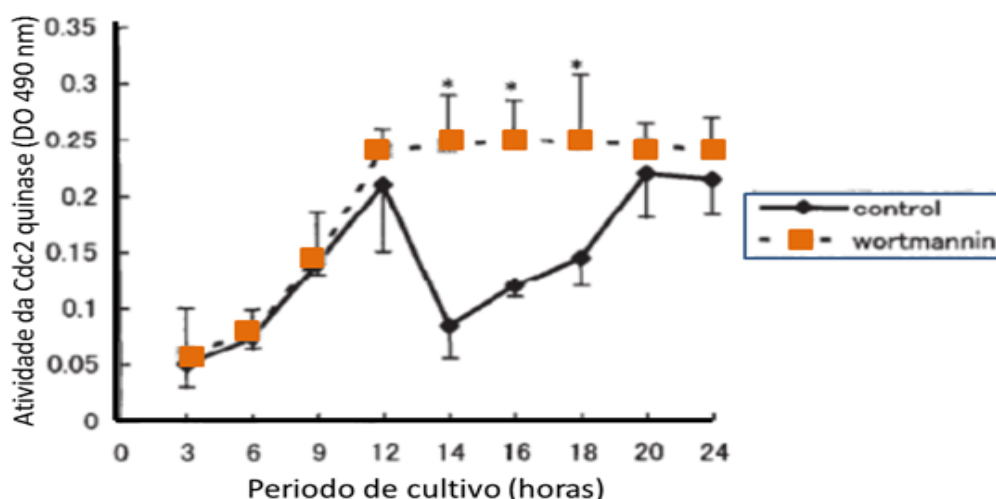


Figura 8. Efeito do *wortmannin* na atividade da CDC2 quinase de oócitos bovinos maturados *in vitro*. Valores com asterisco foram significativamente diferentes do controle (Adaptado de Anas et al., 2000).

Em processos de movimentação intracelular como a endocitose, o *wortmannin* amplia os endossomos que contêm o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e aumenta a degradação lisossomal deste imitando a atividade da proteína Rab5, o que estimula a fusão dos endossomos causando seu aumento (CHEN e WANG, 2001).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAIS DE EXECUÇÃO

As etapas de coleta e seleção dos complexos *cumulus-oophorus* (CCOs), maturação, fertilização e cultivo *in vitro* foram realizadas no Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

As etapas referentes ao western-blot e à avaliação das quantidades de glicogênio foram realizadas na Unidade de Experimentação Animal (UEA - UENF).

4.2 OBTENÇÃO DOS OÓCITOS

Ovários de vacas em idades variadas foram obtidos em abatedouros do município de Campos dos Goytacazes - RJ. Após a coleta, os ovários foram colocados em garrafas térmicas contendo solução salina (NaCl 0,9%), acrescida de antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). Os oócitos foram aspirados dos folículos ovarianos de 2 a 8 mm de diâmetro, com seringa e agulha 19G (40 x 12 mm) e imediatamente colocados no meio de lavagem.

4.3 CLASSIFICAÇÃO DOS OÓCITOS

Os CCOs foram colocados em placas de Petri (Corning, 100 x 20 mm) para serem lavados com meio 199-Hepes (Sigma, M2520), suplementado com penicilina (50 UI/ml) (P3032) e 100 µg/mL de estreptomicina (S1277) e 5% de soro fetal bovino (Cultilab). A avaliação foi realizada segundo o número de camadas de células do *cumulus* e o aspecto granular uniforme do citoplasma, sendo categorizados como

CCOs grau I, II e III (BALDASSARRE, 2003; TRALDI, 2009). Só foram utilizados na maturação os oócitos classificados como grau I e II. Após avaliação da qualidade, os CCOs foram transferidos para gotas com meio de maturação.

4.4 MATURAÇÃO *IN VITRO*

Os CCOs grau I e II foram colocados em grupos de 20- 30 em gotas de 100 µl de meio de maturação (meio 199- M5017, Sigma; suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 0,5 µg/ml de FSH (Foltropin- Bioniche), 5,0 µg/ml de LH (Lutropin- Bioniche), 50 UI/ml de penicilina (P3032) e 50 µg/ml de estreptomicina (S1277)) e cobertos com óleo mineral em uma placa de Petri onde foram incubados por 22 horas a 38,5 °C, com atmosfera de 5% de CO₂.

Os CCOs selecionados foram distribuídos em dois grupos segundo o tratamento (controle e *wortmannin*). CCOs dos grupos submetidos ao tratamento com inibidor foram maturados nas mesmas condições daqueles do grupo controle, exceto pela adição de *wortmannin* (20 nM) ao meio de maturação.

4.4.1 Avaliação da maturação nuclear

Após 22 horas de maturação *in vitro* os oócitos foram retirados das gotas MIV e lavados em solução de hialuronidase a 0,2% (Hyalozima® Aspen), em PBS (phosphate buffer saline) livre de Ca⁺², com 0,1% de álcool polivinílico (PVA; Sigma P-8136), sendo pipetados sucessivamente, para remoção de suas células do *cumulus*. Após o desnudamento, os oócitos foram fixados entre lâmina e lamínula. Uma vez ali se mantiveram por 24 a 48 h em etanol/ácido acético (Merck S. A. Indústrias, Rio de Janeiro, Brasil) (3:1vv). Após esse período de fixação, os oócitos foram corados com orceína acética 2% (Sigma O7505) e observados em microscópio óptico (Eclipse TE 300, NIKON) (600x) para determinação dos estádios de maturação nuclear. A presença do primeiro corpúsculo polar no espaço

perivitelínico acompanhado da metáfase II (MII) foi considerada como indicativo de maturação nuclear (Figura 9).

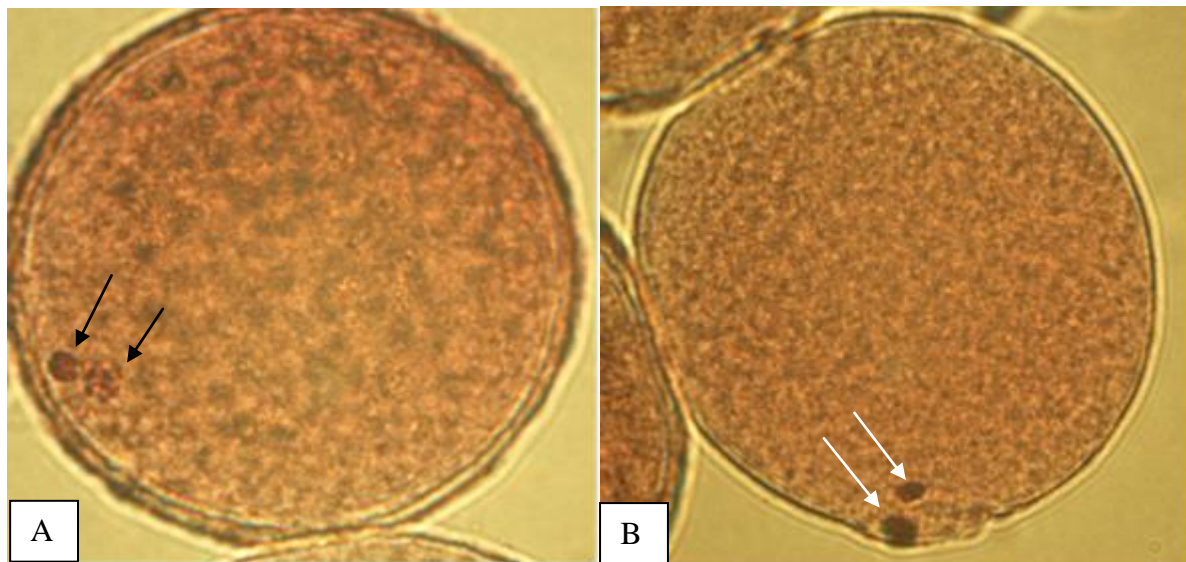


Figura 9. Coloração de orceína acética (A). Oócito em anáfase-telófase I com setas pretas sinalizando os acúmulos de cromatina (um deles descondensado); (B) Oócito em metáfase II mostrando dois acúmulos de cromatina correspondentes ao núcleo e corpúsculo polar (setas brancas). Microscópio de epifluorescência (600X).

4.4.2 Avaliação da maturação citoplasmática

Após 22 horas de maturação *in vitro*, os oócitos foram retirados de suas gotas MIV e lavados em 600 μ l de solução de PBS adicionado de 5% de SFB em uma placa de 4 poços onde foram pipetados múltiplas vezes (± 50) com micropipeta de 200 μ l, para remoção das células do *cumulus*. Os oócitos que persistiram com células do *cumulus* foram colocados em solução de hialuronidase a 10%. Logo depois foram lavados em três gotas de 200 μ l em uma placa de Petri para finalmente reuni-los em uma só gota de 30 μ l de pronase onde permaneceram por 5 -8 minutos para dissolução da zona pelúcida.

Em seguida, foram fixados em solução de paraformaldeído a 3%(Mallinckrodt 5016) em PBS durante 30 minutos, à temperatura ambiente e finalmente transferidos para solução de bloqueio SB - [PBS (solução salina tamponada com

fosfato) com 1mg/mL de albumina sérica bovina (BSA; Sigma A-6003), 100 mM de glicina (Plusone 17-1323-01)], sendo incubados a 4°C durante uma noite. Para a permeabilização da membrana, os oócitos foram expostos à solução de bloqueio (SB) acrescida de 0,1% de Triton X-100 (USB 22686) e mantidos assim por 5 minutos a 38°C.

Em seguida os oócitos foram mantidos em 10µg/mL de conjugado de isotiocianato de fluoresceína *Lens culinaris* (FITC-LCA) (Calbiochem), em SB, por 15 minutos e lavados em SB (5 min cada lavagem) e então colocados sob lâmina e lamínula e visualizados com auxílio de um microscópio óptico de epifluorescência ($\lambda = 460$ a 490 nm). A distribuição dos GC foi utilizada como indicativo de maturação citoplasmática.

Oócitos foram classificados como maduros quando apresentaram marcação periférica (ou em processo de transição para periferia) e imaturos quando apresentaram marcação fluorescente distribuída por todo o citoplasma (clusters) (Figura 10).

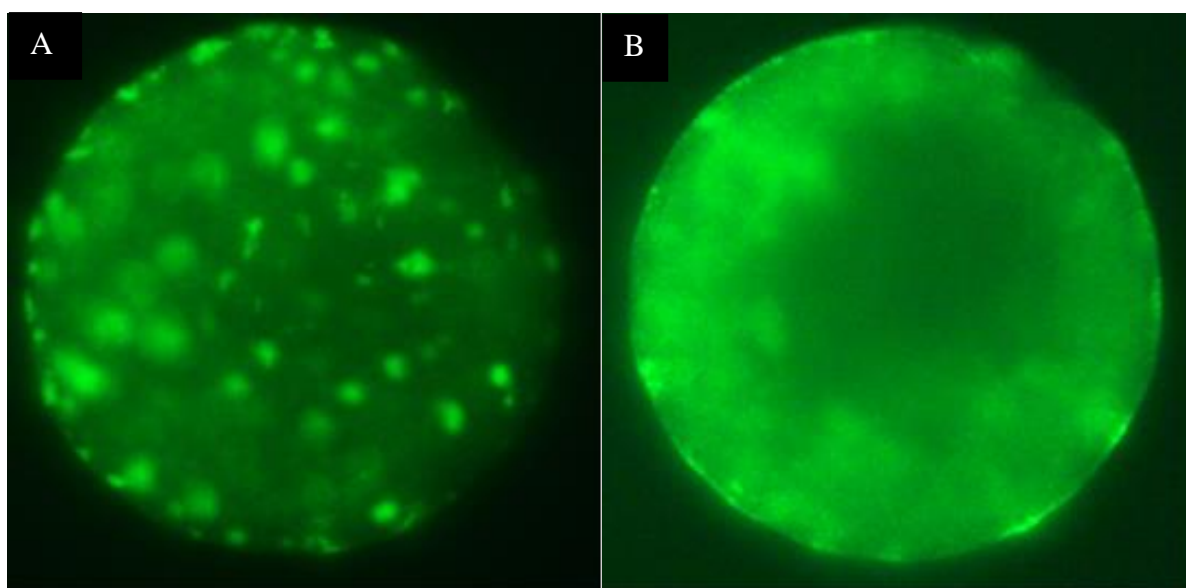


Figura 10. Marcação de grânulos corticais com FITC-*Lens culinaris* para determinação da maturação citoplasmática. Oócito imaturo (A) mostrando os acúmulos de grânulos corticais por todo o citoplasma, e maturado (B) mostrando o acúmulo de grânulos na periferia (600X).

4.5 QUANTIFICAÇÃO DA PI3K POR WESTERN-BLOT

Oócitos maturados *in vitro* foram desnudados e rompidos pela técnica de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido em PBS sem Ca^{+2} e Mg^{+2} , e Triton X-100 0,1%. A concentração do homogenato de cada tratamento foi normalizada pela dosagem de proteínas totais.

Para a imunoprecipitação, uma alíquota referente a 200 μg de proteínas totais foi acrescida de 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de proteína A agarose, sendo incubada por 10 min. a 4°C. Passado esse tempo foi feita uma centrifugação a 6000 x *g* por 10 min., a 4°C. O sobrenadante foi transferido e adicionado o anticorpo anti-PI3K subunidade P85 2 $\mu\text{L}/80$ μg de proteínas totais; Santa Cruz Biotechnology Inc, permanecendo por 2 horas ou overnight em agitação a 4°C.

Adicionou-se então proteína A agarose, na proporção de 50 μL para cada 1 mL de homogenato, incubando por 1 hora a 4°C. Depois o material foi centrifugado por 1 minuto a 14.000 x *g* a 4°C., desprezando o sobrenadante e lavando o *pellet* três vezes com PBS. Posteriormente o pellet foi resuspenso com tampão de amostra e fervido por 10 min.

Em seguida se realizou a eletroforese em condições desnaturantes, transferindo o material para o gel de poliacrilamida a 10%, com amperagem constante de 40 mA. Terminada a migração de proteínas, o material do gel foi então transferido para uma membrana de PVDF em equipamento de transferência semisseco, com amperagem fixa baseada na área do gel (Bio Rad sistema Semi-Dry). O tempo de transferência foi de aproximadamente 2 horas. A membrana foi bloqueada com tampão TBS-tween com 3 % de leite desnatado, por 3 horas.

Passado esse tempo, a membrana foi incubada com o anticorpo primário PI3-kinase p85 α (Z-8) sc-423 (Santa Cruz Biotechnology) *overnight*. No dia seguinte, lavou-se a membrana três vezes com tampão TBS-tween + leite (3%) e então se aplicou o anticorpo secundário (anticoelho conjugado a peroxidase) por 2 horas. Por fim a membrana foi lavada novamente e incubada com a solução reveladora.

A quantidade relativa das proteínas foi determinada por densitometria, usando o programa computacional Gel Perfect (BOZZO E RETAMAL, 1991), a partir de imagens dos géis no formato TIFF obtidas em um *scanner* comercial em 400 dpi

ou por fotografia direta da membrana de nitrocelulose. O programa calcula a mobilidade relativa (Rf) de cada banda corada e a área ocupada por ela, dando também uma apresentação diagramática das bandas proteicas e sua concentração relativa em relação ao total de proteínas por canal.

4.6 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE E GLICOGÊNIO NOS OÓCITOS

Os oócitos foram congelados em água bidestilada e estocados em tubos cônicos até completar 50 oócitos por tratamento em um volume de 50 μ l. As amostras foram descongeladas e trabalhadas por triplicata colocando 16 μ l em cada repetição.

Uma vez preparadas as três amostras de cada tratamento, adicionou-se tampão acetato de sódio (AcNa) até completar 160 μ l. Em paralelo foi preparada igual quantidade de tubos com soluções de concentrações conhecidas de glicogênio (de 0 a 24 μ g) a fim de fazer a curva padrão e logo depois foram adicionados 40 μ l da enzima amiloglicosidase para completar 200 μ l em cada tubo.

Cada tratamento teve uma das repetições onde não foi adicionada a enzima, que serviu como branco da amostra para estabelecer a quantidade de glicose livre presente na amostra desde o início que não provém do glicogênio. Neste momento incubou-se em banho-maria por 4 horas a 40 °C.

Ao terminar a incubação adicionaram-se 300 μ l de PBS e 500 μ l de reagente Glucox 500 (Dole's laboratórios, Goiânia-GO-Brasil) e incubou-se por mais 15 minutos a 37 °C. Logo depois foi realizada a leitura da absorbância a 510 nm e realizou-se as respectivas comparações dos conteúdos de glicose comparando com as quantidades conhecidas da curva padrão.

4.7 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE OOCITÁRIA

Para a determinação da viabilidade oocitária foi realizada uma marcação duplas dos oócitos maturados *in vitro* com iodeto de propídio iodeto de propídio (IP, Sigma P4170) (10µg/mL, em PBS) e calceína AM (Fluka) (1 µg/mL).

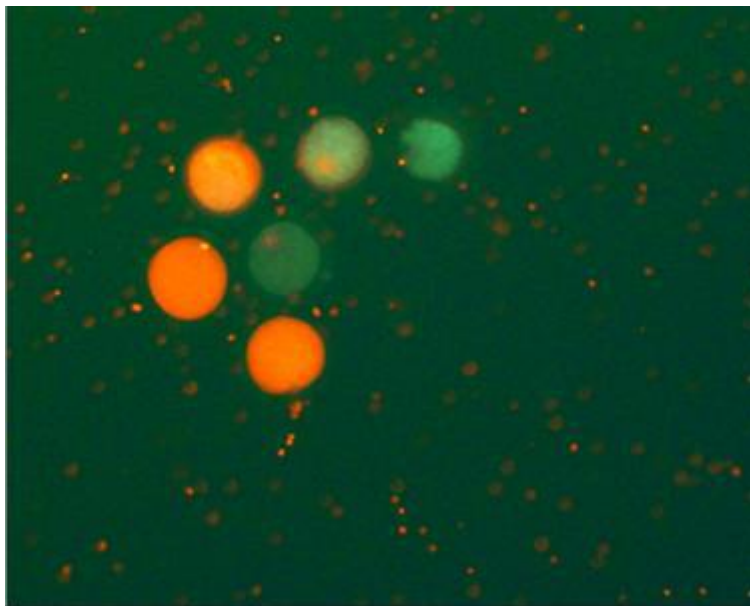


Figura 11. Marcação fluorescente de oócitos bovinos maturados *in vitro* com calceína e iodeto de propídio. Oócitos viáveis (verde) e não viáveis (vermelho). (100X).

Complexos *cumulus oophorus* marcados pela calceína emitiram fluorescência verde sendo considerados como (viáveis), enquanto aqueles marcados pelo IP emitiram fluorescência vermelha e foram considerados não viáveis (Figura 11).

4.8 AVALIAÇÃO DO CITOESQUELETO

Foi avaliado o efeito dos tratamentos sobre a organização do fuso meiótico e a distribuição dos microfilamentos dos oócitos tratados com ou sem inibidor (após 22 horas de maturação). Realizou-se a marcação dos microfilamentos com faloidina-FITC, e dos microtúbulos pela incubação com o anticorpo primário anti α -tubulina, seguido de anticorpo secundário.

Os oócitos foram desnudados por pipetagem em solução de PP (PVA 0,01 g em 10 ml de PBS) em placas de 4 poços, sob observação no microscópio estereoscópio. Uma vez desnudados, estes foram fixados em solução de formaldeído 4% e posteriormente colocados em uma solução de permeabilização (Triton x 100 ao 0,5%), em seguida em uma solução de bloqueio contendo BSA 3% e finalmente foram marcados com α -tubulina conjugada com FITC (1:100), onde permaneceram por uma hora em ambiente protegido da luz. Outra parte desses oócitos foi incubada com faloidina (0,8 U/ mL).

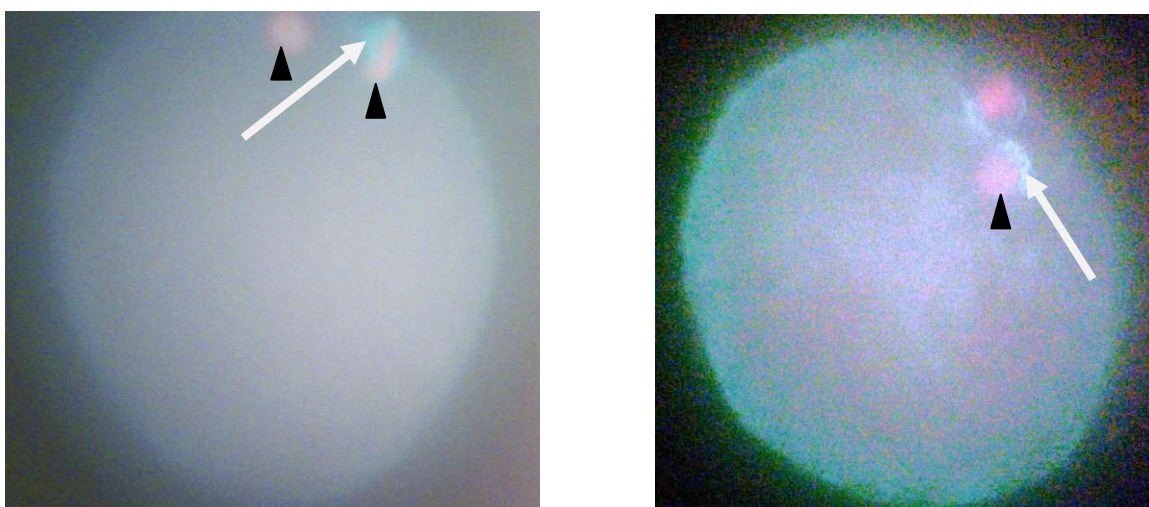


Figura 12. Oócitos maturados marcados com α -tubulina para determinação da formação do fuso meiótico (setas brancas), e com iodeto de propídio, para detecção da cromatina (cabeça de seta) (600X).

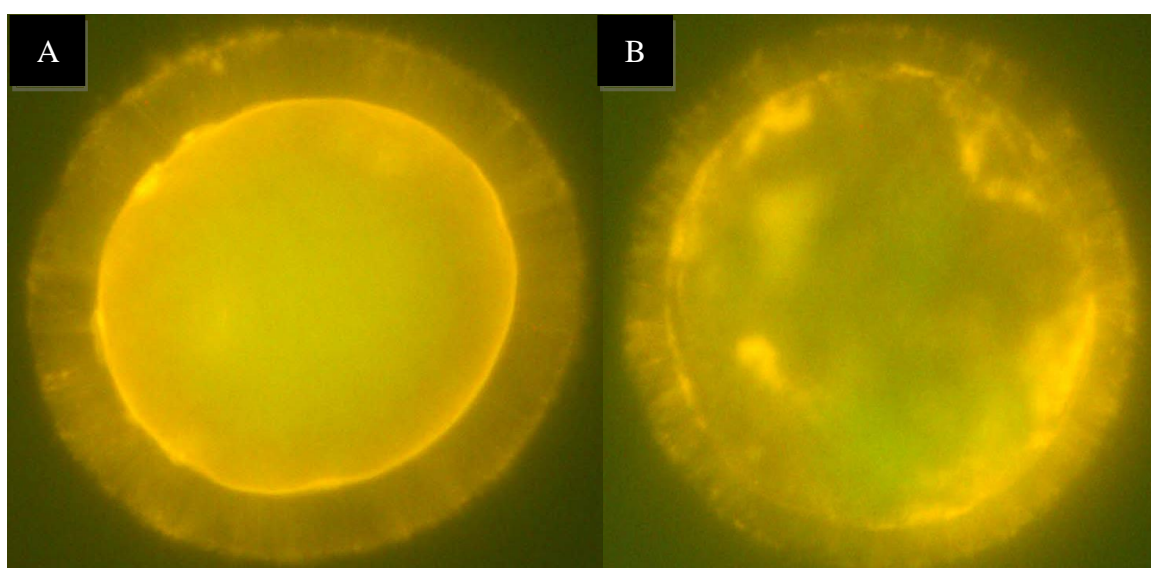


Figura 13. Oócitos bovinos maturados marcados com faloidina para caracterização dos padrões de distribuição de actina. A - oócito com distribuição normal. B - distribuição anormal de actina ((600X).

Os oócitos também foram analisados com auxílio de um microscópio invertido de epifluorescência para a observação dos padrões de distribuição dos microfilamentos de actina (verde) e a formação do fuso meiótico pelos microtúbulos (azul). Estas marcações foram acompanhadas da marcação da cromatina com iodeto de propídio para facilitar a localização do fuso meiótico (Figuras 12 e 13).

4.9 FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

Para realizar a fertilização *in vitro* o sêmen foi descongelado a 37 °C por 30 segundos e colocado em um tubo com o gradiente de *percoll* previamente preparado para logo depois centrifugar a 700 G por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 2 mL de meio de capacitação. Posteriormente foi realizada outra centrifugação por 7 minutos, a 300 G. Então, o *pellet* foi ressuscitado em meio de fertilização e a concentração final ajustada para 1×10^6 espermatozoides por mL.

Enquanto realizou-se a seleção dos espermatozoides, os oócitos foram lavados em três gotas de meio de lavagem e duas de meio FIV. Finalmente os oócitos foram colocados nas gotas com meio FIV e cobertos com óleo mineral para logo depois adicionar os espermatozoides às gotas. A placa contendo os oócitos e espermatozoides ficou na incubadora por 18 horas em condições reguladas de temperatura (38.5 °C), pressão de CO₂ (5 %) e umidade saturada.

4.10 CULTIVO *IN VITRO*

Os prováveis zigotos foram retirados das gotas de FIV e lavados em três gotas desse meio e duas de meio de cultivo previamente preparado e estabilizado na incubadora. Uma vez colocados nas gotas de médio CIV foram mantidos nas condições previamente descritas de pressão, umidade e temperatura, por sete dias. No dia 2 (dia zero sendo o dia da fertilização) foi realizada a avaliação da clivagem e

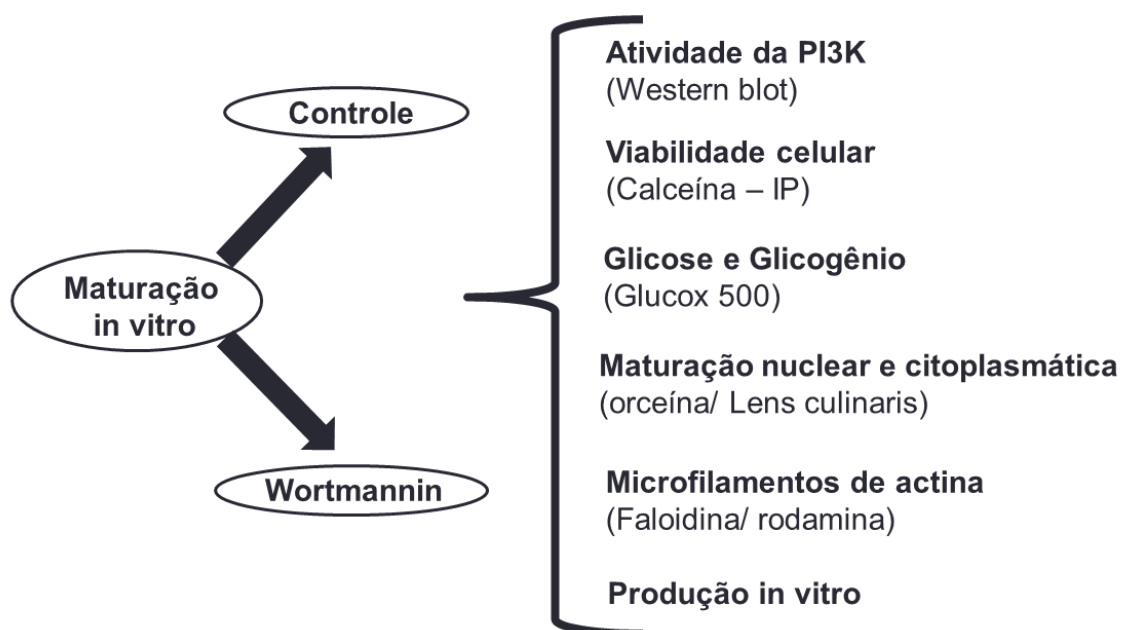
no dia 4 realizou-se o *feeding*. Finalmente a avaliação da taxa de blastocistos foi realizada no dia 8.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A maturação *in vitro* dos oócitos foi realizada em gotas de 100µl de meio de cultivo contendo 25 a 30 oócitos para cada tratamento, por repetição e um mínimo de seis repetições (150 oócitos) por tratamento.

Foi realizada a análise de variância (Proc GLM, SAS, 2003) das variáveis: quantidade de glicose e glicogênio por oócito, taxa de oócitos que atingiram a maturação nuclear e citoplasmática, taxa de viabilidade celular dos oócitos maturados, padrão de distribuição da actina e alfa tubulina e taxa de blastocistos. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste t. (SAS, 2003).

6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR

A maturação nuclear, avaliada pela presença da placa metafásica nos oócitos bovinos não foi influenciada pelo tratamento com o inibidor da PI3K (Tabela 1).

Possivelmente esses resultados foram decorrentes da baixa concentração (20 nM) do *wortmannin* utilizada em nosso trabalho. A ação desse inibidor da PI3K sobre a progressão da meiose tem um efeito dose resposta. Oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com 10^{-8} , 10^{-7} ou 10^{-6} M de *wortmannin* resultaram em $55,9 \pm 2,9$; $29,7 \pm 1,9$ e $22,8 \pm 1,8$ % de oócitos em metáfase II, respectivamente, enquanto o grupo controle apresentou $80,9 \pm 1,1$ % de oócitos em metáfase II (Anas et al., 1998).

Tem sido sugerido que a GSK-3 participa da organização do fuso meiótico. Wakefield et al. (2003) e Wang et al. (2003) descreveram que essa enzima está presente nos microtúbulos do fuso meiótico e que uma fração dela encontra-se fosforilada durante a fase M do ciclo celular, sendo abundante nos centrossomos e polos do fuso. Dessa forma, nossos resultados podem sugerir que o grau de inibição da PI3K pelo tratamento dos oócitos com o *wortmannin* não afetou a ação da GSK-3 com relação à formação do fuso.

Tabela 1. Progressão da meiose de oócitos bovinos maturados *in vitro* na presença do *wortmannin*

Tratamento	Metáfase I	Anáfase I / Telófase I	Metáfase II
Controle	6,2%±4,15%	11,72%±9,26%	82,05%±12,88%
Wortmannin	16,35%±16,15%	5,9%±5,64%	77,75%±21,6%

Valores são percentagens médias \pm desvios padrão. Teste t ($p \leq 0,05$)

7.2 AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA

A inibição da PI3K pelo *wortmannin* resultou em um aumento significativo ($p \leq 0,05$) da maturação citoplasmática, determinada pela migração dos grânulos corticais (Tabela 2).

Tabela 2. Percentual de oócitos que atingiram a maturação citoplasmática após 22 horas de maturação *in vitro*.

Tratamento	Maturados	Não Maturados
Controle	72,80 % \pm 11,82 % ^B	27,11 % \pm 11,81 % ^A
<i>Wortmannin</i>	87,41 % \pm 11,43% ^A	12,62 % \pm 11,44 % ^B

Médias e desvios padrão seguidos de letras diferentes na mesma coluna, diferem significativamente. Teste t (0,05)

O aumento da porcentagem de oócitos que atingiram a maturação citoplasmática pode estar relacionado a alterações no padrão de atividade do MPF durante a retomada da meiose. Anas *et al.* (2000) demonstraram que oócitos bovinos maturados na presença do *wortmannin* apresentaram uma atividade do MPF aproximadamente estável durante todo o período de maturação, enquanto nos oócitos controle a atividade do MPF apresentou uma redução importante por volta das 14 h da maturação, havendo em seguida uma recuperação até atingir a atividade máxima por volta das 20 – 24 h da maturação *in vitro*. Esse comportamento do MPF nos oócitos tratados pelo *wortmannin* pode ter favorecido os mecanismos de migração dos grânulos corticais observados no presente trabalho.

A migração de grânulos corticais é um evento que envolve modificações bem controladas do citoesqueleto, particularmente dos microfilamentos de actina. Chen e Wang (2001) demonstraram um efeito direto do *wortmannin* sobre a movimentação de endossomos durante eventos de endocitose do receptor do fator de crescimento epidermal (ECFR), pela ativação da proteína Rab5 e não pela ação sobre a PI3K. Tal situação denota uma ação direta do *wortmannin* sobre a organização dos microfilamentos, o que poderia ter um efeito na migração dos grânulos corticais.

A migração de grânulos corticais também é influenciada pela proteína quinase C (PKC), que tem sido relacionada também com a retomada da meiose (Ducibella e Fissore, 2008). A inibição da PI3K pelo *wortmannin* pode causar um acúmulo de fosfatidil inositol 2 fosfato (PIP2), interrompendo assim a cascata tradicional da via da insulina. O PIP2 é o substrato da fosfolipase C gamma (PLC γ), que é decomposto em inositol 3 fosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). Este último é um ativador da PKC.

7.3 EFEITO DO WORTMANNIN SOBRE A ATIVIDADE DA PI3K

Oócitos maturados na presença do *wortmannin* apresentaram uma redução parcial da atividade da PI3K. A análise densitométrica das bandas obtidas de oócitos controle e tratados com *wortmannin* mostrou que a banda proteica da subunidade P85 (subunidade ativadora da PI3K) referente aos oócitos tratados com *wortmannin* apresentou uma redução de aproximadamente 30 % em relação à banda obtida dos oócitos controle (Figura 14).

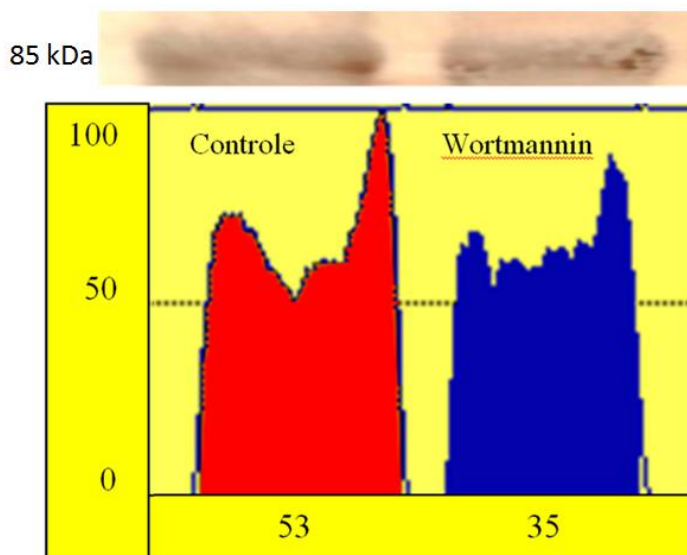


Figura 14. Análise densitométrica das bandas proteicas da subunidade P-85, de oócitos bovinos maturados in vitro na ausência (controle – vermelho) ou na presença do *wortmannin* (azul).

A redução parcial da atividade da PI3K pode ter sido consequência da baixa concentração utilizada do inibidor (20 nM). O *wortmannin* tem sido usado em diferentes concentrações segundo a espécie e o tipo de células cultivadas. Riley *et al.* (2006) utilizaram concentrações de 100 nM no cultivo *in vitro* de embriões bovinos, o que resultou em uma redução na taxa de blastocistos. Xu *et al.* (2009) trabalharam também com a concentração de 20 nM, mas durante a etapa de cultivo *in vitro* de embriões de camundonga. Nessa condição houve uma redução na taxa de clivagem e de blastocisto. Entretanto, a utilização do *wortmannin* (20 nM) apenas durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos resultou em um aumento significativo da taxa de blastocistos (Gomes, 2010).

7.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE E GLICOGÊNIO

O tratamento dos oócitos com *wortmannin* durante a maturação *in vitro* não causou nenhuma alteração nas concentrações de glicose (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito do tratamento de oócitos bovinos com *wortmannin* durante a maturação *in vitro*, sobre a concentração de glicose e glicogênio

<i>Tratamento</i>	<i>Glicose</i> ($\mu\text{g}/\text{oócito}$)	<i>Glicogênio</i> ($\mu\text{g}/\text{oócito}$)
Controle	0,15 \pm 0,043	0,306 \pm 0,032
<i>wortmannin</i>	0,184 \pm 0,045	0,29 \pm 0,06

Médias e desvios padrão seguidos da mesma letra não têm diferença pelo teste t em 5%

Considerando que a PI3K ativa a AKT e esta estimula a ação de GLUT-1 e GLUT-4 para captação de glicose extracelular, o tratamento com *wortmannin* poderia causar uma redução na concentração de glicose nos oócitos (RILEY *et al.*, 2006). A ausência de alterações resultantes do tratamento com o inibidor da PI3K sugere que a atividade da AKT não foi influenciada notoriamente pelo tratamento.

Provavelmente esse fato está relacionado ao metabolismo energético do oócito, o qual utiliza principalmente o piruvato, em detrimento da glicose, como fonte energética (GOPICHANDRAN e LEESE, 2003).

De forma semelhante, a concentração de glicogênio nos oócitos bovinos maturados *in vitro* na presença do inibidor da PI3K não foi influenciada pelo tratamento com o *wortmannin* (Tabela 3).

Esses resultados sugerem que o tratamento não afetou a atividade da glicogênio sintase (GS), a qual faz parte da cascata da PI3K/AKT. Assim a ativação da PI3K resulta na ativação GS, pela ação inibitória da PI3K sobre a GSK-3, a qual controla a atividade da GS.

7.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE OOCITÁRIA

Visando determinar possíveis efeitos deletérios do *wortmannin* sobre os oócitos, foi utilizada a marcação desses gametas com calceína-AM. A viabilidade ovocitária não apresentou diferenças significativas ($p \leq 0,05$ %) entre oócitos maturados na presença do *wortmannin* e os oócitos controle (Tabela 4). Tais resultados confirmam que o tratamento com o inibidor da PI3K não causou alterações importantes que pudessem interferir na viabilidade dos gametas.

Tabela 4. Viabilidade de oócitos bovinos tratados com *wortmannin* após 22 horas de maturação *in vitro*.

<i>Tratamento</i>	<i>Viáveis</i>	<i>Não viáveis</i>
Controle	77,56 ± 8,45 %	22,43 ± 8,45 %
<i>Wortmannin</i>	72,23 ± 6,92 %	27,76 ± 6,92 %

Médias e desvios padrão seguidos da mesma letra não têm diferença pelo teste *t* em nível de 5%

Mesmo sendo o *wortmannin* um inibidor irreversível da PI3K (POWIS *et al.*, 1994) sua inativação dependente da concentração utilizada. A redução de aproximadamente 30 % da atividade da PI3K observada nos oócitos expostos ao

wortmannin no presente trabalho não foi suficiente para induzir alterações que comprometessem a viabilidade dos oócitos.

7.6 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE ACTINA E MITOCÔNDRIAS

Foram realizadas avaliações do padrão de distribuição dos microfilamentos de actina (faloidina) e de mitocôndrias (rodamina-faloidina) visando determinar os efeitos do *wortmannin* sobre esses aspectos da maturação citoplasmática.

Os resultados encontrados não mostraram alterações significativas ($p \geq 0,05$) nos padrões de distribuição das mitocôndrias (Tabela 5), assim como na organização dos microfilamentos (Tabela 6) induzidos pelo tratamento com *wortmannin*.

Tabela 5. Padrão de distribuição mitocondrial em oócitos bovinos tratados com *wortmannin* durante a maturação *in vitro*

Tratamento/Padrão	Normal	Alterado
Controle	94,65 % \pm 2,9	5,2 % \pm 3,11
Wortmannin	96,75 % \pm 0,63	3,25 % \pm 0,63

Valores são percentuais médias e respectivos desvios padrão. Teste t ($p \leq 0,05$)

Tabela 6. Padrão de distribuição de microfilamentos de actina em oócitos bovinos tratados com *wortmannin* durante a maturação *in vitro*

Tratamento/Padrão	Normal	Alterado
Controle	89,23 % \pm 5,8	10,76 % \pm 5,8
Wortmannin	89,73 % \pm 1,7	10,26 % \pm 1,7

Valores são percentuais médios e respectivos desvios padrão. Teste t ($p \leq 0,05$)

7.7 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

A maturação *in vitro* de oócitos bovinos na presença de concentrações nanomolares do *wortmannin* não alterou a taxa de clivagem, mas promoveu um aumento significativo ($p \leq 0,05$) na taxa de blastocistos (Tabela 7).

Os resultados da taxa de blastocistos apresentaram médias mais baixas que o descrito na literatura, possivelmente pelo efeito da época do ano que foi realizado o experimento (março a maio de 2012), período no qual ocorre frequentemente uma redução na quantidade e qualidade das pastagens da região.

A suplementação do meio de maturação *in vitro* de oócitos com *wortmannin* na concentração de 20 nM também foi utilizada por Gomes (2010), que reportou um aumento significativo ($p \leq 0,05$) na taxa de blastocistos ($58,0 \pm 4,9\%$ vs $29,0 \pm 4,5\%$), e sem diferenças significativas ($p \geq 0,05$) na taxa de clivagem.

Tabela 7. Influência do *wortmannin* nas taxas de clivagem e de blastocistos bovinos

Tratamento	Taxa de Clivagem (%)	Taxa de Blastocistos (%)
Controle	70,94 ± 15,16	20,00 ± 4,97 ^a
Wortmanin	77,1 ± 6,14	34,25 ± 6,4 ^b

Médias e desvios padrão seguidos de letras diferentes na mesma coluna, diferem significativamente. Teste t (0,05)

Esses resultados, juntamente com os do presente trabalho, corroboram a ideia de que a etapa da maturação influencia a quantidade de embriões produzidos *in vitro* (Rizos *et al.*, 2002b). Dessa forma, pode-se sugerir que o tratamento utilizado resultou em uma melhoria da maturação oocitária com o conseqüente aumento na taxa de blastocistos.

Tal resultado não foi relacionado com mudanças no metabolismo energético dos oócitos, uma vez que não foram encontradas alterações nas concentrações de glicose e glicogênio medidas após 22 h de maturação *in vitro*. Da mesma forma, a

maturação nuclear, provavelmente, não foi influenciada pelo tratamento com *wortmannin*, visto que não foram observadas alterações no percentual de oócitos em metáfase II após o período de maturação *in vitro*. No entanto, como a determinação da formação da placa metafásica só foi avaliada após as 22 h da MIV, resta determinar se os tempos da progressão meiótica foram alterados pelo tratamento. Anas *et al.* (1998) descreveram uma redução da maturação nuclear, dose dependente do *wortmannin*, durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

Apesar de não terem sido observadas modificações na distribuição de microfilamentos e de mitocôndrias, a migração dos grânulos corticais, forma mais comumente utilizada para avaliação da maturação citoplasmática, apresentou uma melhoria nos oócitos tratados com o *wortmannin*. Em conjunto os resultados da maturação nuclear e migração de grânulos corticais sugerem uma melhor sincronia desses eventos nos oócitos tratados com o inibidor da PI3K, o que está relacionado com a melhoria da qualidade da maturação *in vitro* (BLONDIN *et al.*, 1997).

Considerando que o *wortmannin* é um inibidor irreversível (POWIS *et al.*, 1994), a redução da atividade da PI3K, como demonstrado pelo western blot, pode sugerir que o tratamento com esse inibidor pode ter controlado possíveis alterações da atividade dessa enzima provocada pelo sistema *in vitro*. Wrenzycki *et al.* (2004) descreveram a ocorrência de mudanças epigenéticas durante o desenvolvimento implantacional resultante de alterações nos padrões de expressão gênica dos embriões produzidos *in vitro*.

A PI3K atua indiretamente ativando a AKT, enzima envolvida na regulação do metabolismo energético, na sobrevivência celular, na tradução de proteínas, no crescimento celular e na apoptose. Dessa forma, a ativação dessa enzima poderia contribuir para a melhoria da qualidade da maturação oocitária. No entanto, a melhoria dos resultados obtidos com a migração dos grânulos corticais e na taxa de blastocistos sugerem que a inibição da PI3K não afetou a atividade dessa enzima.

8. CONCLUSÕES

Foi avaliada a atividade da enzima PI3K nos oócitos bovinos durante a maturação *in vitro* demonstrando que sua atividade diminui nos oócitos quando se utiliza o inibidor *wortmannin* no meio de maturação. A inibição alcançada com a concentração de 20 nM do inibidor foi de aproximadamente um terço (34 %) com o que a viabilidade celular e a maturação nuclear não foram afetadas.

Foi demonstrado também que os níveis de glicose e glicogênio não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao controle, quando se utilizou o inibidor da PI3K, o que permite concluir que o grau de inibição alcançado com a concentração utilizada no trabalho, não afetou o metabolismo energético do oócito durante a etapa de maturação.

Conclui-se que PI3K participa da maturação de oócitos bovinos e que a redução da sua atividade pelo uso do inibidor *wortmannin*, em concentrações nanomolares, acelera a migração dos grânulos corticais permitindo uma maior sincronia com a maturação, o que pode ter contribuído para a melhoria alcançada na taxa de produção dos blastocistos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCILI, D; ARDEN, K. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. **Cell**, v.117, p.421-426, 2004.

ACEVEDO, N., WANG, X., DUNN, R.; SMITH, G. Glycogen synthase kinase-3 regulation of chromatin segregation and cytokinesis in mouse preimplantation embryos. **Molecular reproduction and development**, v. 74, p. 178- 188, 2007.

ALBARRACIN, J; MORATÓ, R; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T. Effects of roscovitine on the nuclear and citoesqueletal components of calf oocytes and subsequent development. **Theriogenology**, v. 64, p. 1740- 1755, 2005.

ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4ed, Artmed, Porto Alegre, 2004.

ANAS, M.K.I.; SHIMADA, M.; TERADA, T. Possible role for phosphatidylinositol 3-kinase in regulation meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. **Theriogenology**, v.50, p.347-356, 1998.

ANAS, M., SHOJO, A., SHIMADA, M.; TERADA, T. Effects of *wortmannin* on the kinetics of GVBD and the activities of the maturation-promoting factor and mitogen activated protein kinase during bovine maturation in vitro. **Theriogenology**, v. 53, p. 1787- 1806, 2000.

ANDRADE, E.; MARCONDES, M.; ALFIERI, A.; OLIVEIRA, J. De.; RODRIGUES, A.; TONIOLLI, R. Interactions of indol acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.64, p. 1104- 1113, 2005.

ARAUJO, C; MEDEIROS, M; MARTINS, W; FERRIANI, R.; Dos Reis, R. Gametogênese: estágio fundamental do desenvolvimento para reprodução humana. **Revista Medicina, Ribeirão Preto**, v. 40, p. 551- 558, 2007.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; et al. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. **Theriogenology**, v.59, p.831-839, 2003.

BAUDLER, S.; BAUMGARTL, J.; HAMPEL, B.; BUCH, T.; WAISMAN, A.; SNAPPER, C.; KRONE, W.; BRUNING, J. Insulin-Like Growth Factor-1 Controls Type 2 T Cell-Independent B Cell Response. **Journal of Immunology**, v. 174, p. 5516- 5525, 2005.

BEVERS, M; DIELEMAN, S; VAN DEN HURK, R.; IZADIAR, F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v. 47, p. 13; 22, 1997.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L.A.; SIRARD, M.A. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, v.47, p. 1061- 75, 1997.

BLUME-JENSEN, P.; HUNTER, T. Oncogenic kinase signalling. **Nature**, v.411, p.355-365, 2001.

BOZZO, S.; RETAMAL, C. Geles unidimensionales. Un nuevo método densitométrico para computadores personales. **Archivos de Biología e Medicina Experimental**, v. 24, p. 181, 1991.

BREVINI, T.; LONERGAN, P.; CILLO, F.; FRANCISCI, C.; FAVETTA, L.; FAIR, T. *et al.* Evolution of mRNA polyadenylation between oocyte maturation and first embryonic cleavage in cattle and its relation with developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, p. 510– 517, 2002.

CAMPBELL, K.; LOI, P.; OTAEGUI, P.; WILMUT, I. Cell cycle coordination in embryo cloning by nuclear transfer. **Rev. Reproduction** 1, 40-46, 1996.

CHEN, C.C. Human corneal epithelial cell viability and morphology after dilute alcohol exposure. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.43, p.2593-2602, 2002.

CHEN, K.; OBINATA, H.; IZUMI, T. Detection of G protein-coupled receptor-mediated cellular response involved in cytoskeletal rearrangement using surface plasmon resonance. **Biosensors and Bioelectronics** v. 25 p. 1675–1680, 2010.

CHEN, X., WANG, Z. Regulation of epidermal growth factor receptor endocytosis by *wortmannin* through activation of Rab5 rather than inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. **EMBO reports**, v. 2, n. 9, p. 842- 849, 2001.

COGNIÉ Y.; BARIL, G.; POULIN, N. *et al.* Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, v.59, p.171- 188, 2003.

COGNIÉ, Y.; POULIN, N.; LOCATELLI, Y. *et al.* State of the art production, conservation and transfer of in vitro produced embryos in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.437-445, 2004.

COLGAN, D.; MURTHY, K.; PRIVES, C.; MANLEY, J. Cell-cycle related regulation of poly(A) polymerase by phosphorylation. **Nature**, v. 5, p. 384- 282, 1996.

CROZET, N. *In vitro* generation of one cell embryos in sheep and goat. In: **Transgenic animals: generation and use**. Amsterdam: Hardwood Academic Publishers, 576p. 1997.

DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanism regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, p. 19; 25, 2005.

DESSEV, G.; IOVCHEVA-DESSEV, C.; BISCHOFF, J.; BEACH, D.; GOLDMAN, R. A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles nuclei of clam oocytes in vitro. **Journal of Cell Biology**. V. 112, p. 523- 533, 1991.

DOREE, M.; HUNT, T. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 2461- 2464, 2002.

DURANTHON, V.; RENARD, J.P. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. **Theriogenology**, v.55, p.1277-1289, 2001.

DUCIBELLA, T.; FISSORE, R. The roles of Ca²⁺, downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development. **Developmental Biology**, v. 315, p. 257- 279, 2008.

ENGELMAN, J.; LUO, J.; CANTLEY, L. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nature Reviews Genetic**, v.7, p. 606–619, 2006.

FAIR, T., HYTTEL, P., LONERGAN, P., *et al.*, Immunolocalization of nucleolar proteins during bovine oocyte growth, meiotic maturation and fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1516- 1525, 2001.

FAIR, T.; MURPHY, M.; RIZOS, D.; MOSS., C; MARTIN, F.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Analysis of differential maternal mRNA expression in developmentally competent and incompetent bovine two-cell embryos. **Molecular Reproduction and Development**. v. 67, p.136– 144, 2004.

FERBY, I., WAGA, I., KUME, K., *et al.* PAF-induced MAPK activation is inhibited by *wortmannin* in neutrophils and macrophages. **Advanced Experimental Medicine and Biology**, 1996.

FRAME, S.; COHEN, P. GSK3 takes Center stage more than 20 years after its Discovery. **Biochemical Journal**, v. 359, p. 1- 16, 2001a.

FRAME, S.; COHEN, P.; BIONDI, R. A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. **Molecular Cell**, v. 7, p. 1321- 1327, 2001b.

FERMENTEK Biotechnology. *Wortmannin*. Disponível em: www.fermentek.co.il/wortmannin.htm (Consultado em 06/04/20011).

FERNANDEZ, F.; HERNANDEZ, J.; PICHARDO, A. Maduración *in vitro* de ovocitos de ovino usando concentraciones de FSH+LH y FSH em medio de cultivo. **Revista de Salud Animal**, v. 29, p. 105- 110, 2007.

FERNANDES, C.; ROCHA, I.; ARAGAO, I.; VIANA, J. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37 (3), p. 215- 224, 2009.

FERREIRA, E.; VIREQUE, A.; ADONA, P.; MEIRELLES, F.; FERRIANI, R.; NAVARRO, P. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, p. 836- 848, 2009.

FORTUNE, J.E.; CUSHMAN, R.A.; WAHL, C.M.; KITO, S. The primordial to primary follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 163: 53-60, 2000.

GAVIN, A.; SCHORDERET-SLATKINE, S. Ribosomal S6 kinase p90rsk and mRNA cap-binding protein eIF4E phosphorylations correlate with MAP kinase activation during meiotic reinitiation of mouse oocytes. **Molecular Reproduction Development**, v. 46, p. 383– 391, 1997.

GILCHRIST, R.; RITTER, I.E.; ARMSTRONG, D. Oocyte -somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal reproduction science**, v. 82-83, p. 431-446. 2004.

GOMES, H. Influência da via de sinalização por insulina na maturação e desenvolvimento embrionário inicial em bovinos. Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), 2010.

GOPICHANDRAN, N.; LEESE, N. Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid. **Reproduction**, v.126, p. 299–308, 2003.

GOTTLOB, K.; MAJEWSKI, N.; KENNEDY, S.; KANDEL, E.; ROBEY, R.B.; HAY, N. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. **Genes Desenv.** v.15, p. 1406-1418, 2001.

HEO, W.; MEYER, T. Switch-of-function mutants based on morphology classification of Ras superfamily small GTPases. **Cell**, v. 113, p. 315–328, 2003.

HERLER, A.; KRUSCHE, C.; BEIER, H. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1302- 1310, 1998.

HILL, M.; CLARK, S.; TUCKER, D.; BIRNBAUM, M.; JAMES, D.; MACAULAY, S. **Molecular Cell Biology**, v. 19, p. 7771-7781, 1999.

HODGES, R.; RIOS, J.; VROUVLIANIS, J.; OTA, I.; ZOUKHRI, D.; DARTT, D. Roles of Protein Kinase C, Ca²⁺, Pyk2, and c-Src in Agonist Activation of Rat Lacrimal Gland p42/p44 MAPK. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Vol. 47, n. 8. p. 3352-3359, 2006.

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

IETS.statistics and Data Retrieval Committee Report the year 2011 worldwide statics of embryo transfer in domestic farm animal prepared by Brad Stroud, DVM . 2012.

INAGAMI, T.; EGUCHI, S. Angiotensin II-mediated vascular smooth muscle cell growth signaling. **Brazilian Journal of Medicine Biology Research**, v. 33(6), p. 619-624, 2000.

INOUE, T.; MEYER, T. Synthetic activation of endogenous PI3K and Rac identifies an AND-gate switch for cell polarization and migration. **PLoS ONE** (www.plosone.org), v.3, e3068, 2008.

JACKSON, R.; STANDART, N. Do the poly(A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation? **Cell**, v. 62; p. 15– 24, 1990.

JENSEN, P.; GITLIN, J.; CARAYANNOPOULOS, M. GLUT1 Deficiency Links Nutrient Availability and Apoptosis during Embryonic Development. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 19, p. 13382-13387, 2006.

JOHN, G.; SHIDLER, M.; BESMER, P.; CASTRILLON, D. Kit signaling via PI3K promotes ovarian follicle maturation but is dispensable for primordial follicle activation. **Development Biology**, v.331, p. 292-299, 2009.

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

KHATCHADOURIAN, C.; MÉNÉZO, Y.; SAKKAS, D. et al. Incorporation of fructose by the mouse embryo: effect of preimplantation development. **Theriogenology** 42, 1349–56, 1994.

KAN, O.; BALDWIN, S.; WHETTON, A. Apoptosis is regulated by the rate of glucose transport in an interleukin 3 dependent cell line. **Journal Experimental Medicine. Chemical**, v. 180, p. 917-921, 1994.

KANE, M. A review of in vitro gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 171- 190, 2003.

KHURANA, N.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Biology of reproduction**, v. 62, p. 847- 856, 2000.

LEESE, H.; BARTON, A. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 72, p. 9-13, 1984.

LEESE, H.; CONAGHAN, J.; MARTIN, K.; **HARDY**. M Early human embryo metabolism. **Bioessays**, v. 15, p. 259-264, 1993.

LEVESQUE, J.; SIRARD, M. Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1427–1436, 1996.

LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., ROBERTS, T., HIRSBERG, K. Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 16, p. 557- 589, 2000.

LIU, Y., JIANG, N., WU, J., DAI, W., ROSENBLUM, J. Polo-like Kinases Inhibited by *Wortmannin*: Labeling Site and Downstream Effects. **Journal of Biological Chemistry**, n. 282(4), p. 2505-11, 2007.

LODISH, H., BERK, A., MATSUDAIRA, P., KAISER, C., *et al.* **Molecular cell biology**. 4 ed. New York: W.H. Freeman and Company, p. 496, 2000.

LUO, J.; CANTLEY, L. The negative regulation of phosphoinositide 3-Kinase signaling by P85 and its implication in cancer. **Cell Cycle**, v. 4, n. 10, p. 1309- 1312, 2005.

MADGWICK, S.; JONES, K. How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals cytostatic factor. **Cell Division**, v. 2, p. 4, 2007.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. **Trends in Biochemical Science**, v. 30, p. 630- 641, 2005.

MAXIMO, D. Características ultraestruturais de ovócitos ovinos durante a maturação *in vitro*. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília. 2009.

MEDINA-TATO, D.; WARD, S.; WATSON, M. Phosphoinositide 3-kinase signalling in lung disease: leucocytes and beyond. **Immunology**, v.121, p.p. 448–461, 2007.

MEINECKE, B.; JANAS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN; S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reproduction in Domestic Animals**, v.36, p.183-188, 2001.

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

MERIC, F.; SEARFOSS, A.; WORMINGTON, M.; WOLFFE, P. Masking and unmasking maternal mRNA: The role of polyadenylation, transcription, splicing and nuclear history. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271; p. 30804– 30810, 1996.

MERMILLOD, P.; LONERGAN, P.; CAROLAN, C. et al. Maturation ovocytaire *in vitro* chez les ruminants domestiques. **Contraception Fertilité Sexualité**, v.24, n.7-8, p.552- 558, 1996.

MERMILLOD, P.; DALBIÈS-TRAN, R.; UZBEKOVA, S. et al. Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle? **Reproduction in Domestic Animals**, v.43 (suppl. 2), p.393– 400, 2008.

MOTLIK, J.; PAVLOK, A.; KUBELKA, M.; KALOUS, J.; KALAB, P. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation on mammalian oocytes. **Theriogenology**, v. 49, p. 461- 469, 1998.

NERI, S. Calcein-acetoxymethyl cytotoxicity assay: Standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.8, n.6, p.1131-1135, 2001.

PACOLD, M.; SUIRE, S.; PERISIC, O.; LARA-GONZALEZ, S.; DAVIS, C.T.; WALKER, E.H.; HAWKINS, P.T.; STEPHENS, L.; ECCLESTON, J.F.; WILLIAMS, R.L. Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. **Cell**, v. 103, p. 931-943, 2000.

POWIS, G.; BONJOUKLIAN, R.; BERGGREN, M.; GALLEGOS, A.; ROBERT A. *Wortmannin*, a Potent and Selective Inhibitor of Phosphatidylinositol-3-kinase'. **Cancer Research**, v. 54, p. 2419- 2423, 1994.

RATHMELL, J.; FOX, C.; PLAS, D.; HAMMERMAN, P.; CINALLI, R.; THOMPSON, C. Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. **Molecular Cell Biology**. 23, 7315-7328, 2003.

REDDY, P.; SHEN, L.; REN, C.; BOMAN, K.; LUNDIN, E.; OTTANDER, U.; LINDGREN, P.; LIU, Y.X.; SUN, Q.; LIU, K. Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. **Development Biology**, v.281, p.160-170, 2005.

RILEY, J.; CARAYANNOPOULOS. M.; WYMAN. A.; CHI, M.; KELLE, H. Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity Is Critical for Glucose Metabolism and Embryo Survival in Murine Blastocysts. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 9, pp. 6010–6019, 2006.

RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOUPOULUS, S.; BOLAND, M. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, p. 320; 327, 2002 a.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Consequence of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 234- 248, 2002 b.

SALUTE, M.; TUCKER, K. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) in yolk sac fluid, uterine flush and conceptus conditioned media during early pregnancy in mares. **Biology of Reproduction**, 46, 68, 1992.

SAS Institute Inc. SAS user's guide: statistic, version 9.1 Cary, N.C, 2003.

SASAYAMA, T.; MARUMOTO, T.; KUNITOKU, N.; ZHANG, D.; TAMAKI, N.; KOHMURA, E. *et al.* Over-expression of Aurora-A targets cytoplasmic polyadenylation element binding protein and promotes mRNA polyadenylation of Cdk1 and cyclin B1. **Genes Cells** v.10, p. 627– 638, 2005.

SCHMITT, A.; NEBREDA, A. R. Signalling pathways in oocytes meiotic maturation. **Journal of Cell Science**, v.115, p. 2457- 2459, 2002.

SHIM, C.; LEE, S.G.; SONG, W.K.; LEE, C.S.; LEE, K.K.;, KIM, K. Laminin chain-specific gene expression during mouse oocyte maturation. **Molecular Reproduction and Develop**, v. 48, p. 185–193, 1997.

SIRARD, M.; FLORMAN, H.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.; BARNES, F., SIMS, M.; FIRST, N. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 1257- 1264, 1989.

STEFFEN, W.; KARKI, S.; VAUGHAN, K.; VALLEE, R.; HOLZBAUR, E.; WEISS, D. *et al.*, The involvement of the intermediate chain of cytoplasmic dynein in binding the motor complex to membranous organelles of *Xenopus* oocytes. **Molecular Biology Cell**, v. 8, p. 2077- 2088, 1997.

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

STRICKER, S. Structural reorganization of the endoplasmic reticulum during maturation and fertilization. **Seminars in cell and developmental biology**, v. 17, p. 303- 313, 2006.

SUN, Q.; SCHATTEN, H. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. **Reproduction**, v. 131, p. 193- 205, 2006.

SUTTON, M.; CETICA, P.; BECONI, K.; KIND, K.; GILCHRIST, R.; THOMPSON, J. Influence of oocyte secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. **Reproduction**. v. 126, p. 27- 34, 2003.

THACH, R. Cap recap: the involvement of the eIF-4F in regulating gene expression. **Cell**, v. 68, p. 177– 180, 1992.

THIBAUT, C.; SZOLLOSI, D.; GÉRARD, M. Mammalian oocyte maturation. **Reproduction Nutrition Development**, v. 27, p. 885- 896, 1987.

TOMEK, W.; TORNER, H.; KANITZ, W. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 86- 91, 2002.

TRALDI DE SOUZA, A. Produção in vitro de embriões ovinos: uma visão crítica do método e de seu resultado a campo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 301- 306, (suplemento especial) 2009.

TREMBLAY, K.; VIGNEAULT, C.; MCGRAW, S.; SIRARD, M. Expression of cyclin B1 messenger RNA isoforms and initiation of cytoplasmic polyadenylation in the bovine oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 72, p. 1037–1044, 2005.

TSAFRIRI, A.; MOTOLA, S. Are steroids dispensable for meiotic resumption in mammals? **TRENDS in: Endocrinology and Metabolism**, v. 18, n. 8, p. 321-327, 2007.

UZBEKOVA, S.; SALHAB, M.; PERREAU, C.; MERMILLOD, P.; DUPONT, J. Glycogen synthase kinase 3B in bovine oocytes and granulosa cells: possible involvement in meiosis during in vitro maturation. **Reproduction**, v. 138, p. 235- 246, 2009.

VARAGO, F.; MENDONÇA, L.; LAGARES, M. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectivas de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 100- 109, 2008.

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

VANHAESEBROECK, B.; LEEVERS, S.; AHMADI, K.; TIMMS, J.; KATSO, R.; DRISCOLL, P.; WOSCHOLSKI, R.; , PARKER, P.; WATERFIELD, M. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. **Annual Review of Biochemistry**. 2001

VANHAESEBROECK, B.; STEPHENS, L.; HAWKINS, P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. **Molecular Cell Biology**. v 13, p.p 195- 203, 2013.

VOIGT, P.; BROCK, C.; NURNBERG, B.; SCHAEFER, M. Assigning functional domains within the p101 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma. **Journal of Biology and Chemical**. v. 280(6):5121-7, 2005.

WAKEFIELD, J.; STEPHENS, D.; TAVARÉ, J. A role for glycogen synthase kinase-3 in mitotic spindle dynamics and chromosome alignment. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 637- 646, 2003.

WANDJI, S.A.; FORTIER, M.A.; SIRARD, M.A. Differential response to gonadotropins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. **Biology of Reproduction**, 46 :1034-1041, 1992.

WANG, X.; LIU, X.; DUNN, R.; *et al.* Glycogen synthase kinase-3 regulates mouse oocyte homologue segregation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64, p. 96- 105, 2003.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; LEMME, K. E.; KORSawe, H.; NIEMANN, G. Gene expression patterns in in vitro-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 593–603, 2004.

WILLIAMS, C. Signaling mechanism of mammalian oocyte activation. **Human Reproduction Update**, v. 8, P. 313- 321, 2002.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A.; McWHIR, J.; KIND, A.; CAMPBELL, K. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, p. 810- 813, 1997.

WON YANG, H.; SHIN, M.; LEE, S.; KIM, J.; PARK, W.; CHO, K.; MEYER, T.; HEO, W. Cooperative activation of PI3K by Ras and Rho family small GTPases. **Molecular Cell**, 47, 281–290, 2012.

WYMANN, M.; MARONE, R. Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding. **Current Opin Cell Biol.** (2):141-9. PubMed ID:15780590, apr, 2005.

XU, X.; ZHANG, Z.; SU, W.; ZHANG, Y.; FENG, C.; ZHAO, H.; ZONG, Z.; CUI, C.; BING-ZHI, YU. Involvement of the p110a Isoform of PI3K in Early Development of Mouse Embryos. **Molecular Reproduction & Development**, v. 76, p. 389– 398, 2009.

YAMADA, M.; ISAJI, Y. Structural and functional changes linked to, and factors promoting, cytoplasmic maturation in mammalian oocytes. **Reproduction Medicine Biology**, DOI 10.1007/s12522-011-0079-4. 2011.

ZHENG, W.; LIU, K. The emerging role of maternal phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) signaling in manipulating mammalian preimplantation embryogenesis. *Cell Cycle (Landes Bioscience)* 10:2, 178-179; January 15, 2011.

ZHENG, W.; GORRE, N.; SHEN, Y.; NODA, T.; OGAWA, W.; LUNDIN, E.; LIU, K. Maternal phosphatidylinositol 3-kinase signaling is crucial for embryonic genome activation and preimplantation embryogenesis. **EMBO reports**, v. 11, n. 11, 2010.