



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(21) PI 1001686-4 A2**



(22) Data de Depósito: 14/05/2010  
(43) Data da Publicação: 21/01/2014  
(RPI 2246)

**(51) Int.Cl.:**  
**C12N 5/073**  
**C12N 9/99**

**(54) Título:** MEIO MODIFICADO COM PRESENÇA DE INIBIDORES DE ENZIMA PARA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES DE MAMÍFEROS

**(73) Titular(es):** Universidade Est. do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**(72) Inventor(es):** Angelo José Burla Dias, Carla Sobrinho Paes de Carvalho, Carlos Jorge Logullo de Oliveira, Helga Fernandes Gomes, Itabajara da Silva Vaz Junior

**(57) Resumo:** MEIO MODIFICADO COM PRESENÇA DE INIBIDORES DE ENZIMA PARA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES DE MAMÍFEROS

"Meio modificado com presença de inibidores de enzima para produção in vitro de embriões de mamíferos", caracterizado como uma formulação de um meio de cultura utilizado no processo de produção in vitro de embriões, com adição de inibidores da enzima fosfoinosítide 3 quinase (também conhecida como PI3K ou P13 quinase). Em concentrações variando de nanomolar a milimolar, a adição desses inibidores no meio para a produção in vitro de embriões bovinos promoveu uma expressiva elevação da taxa de blastocistos. Foram testados vários inibidores sendo que os melhores resultados foram obtidos com o uso, mas não somente, do inibidor wortmanina.

**MEIO MODIFICADO COM PRESENÇA DE INIBIDORES DE ENZIMA PARA  
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE MAMÍFEROS**

Refere-se o presente invento à formulação de um meio de cultura utilizado no processo de produção *in vitro* de embriões, com adição de inibidores enzima fosfoinositide 3 quinase (também conhecida como PI3K ou PI3 quinase). Em concentrações variando de nanomolarr a milimolar, a adição desses inibidores no meio para a produção *in vitro* de embriões bovinos promoveu uma expressiva elevação da taxa de blastocistos. Foram testados vários inibidores, incluindo SB216763 e 10-DEBC sendo que os melhores resultados foram obtidos com o uso, mas não somente, do inibidor wortmanina.

Atualmente o número de embriões bovinos produzidos *in vitro* supera o dos produzidos *in vivo*, devido principalmente ao maior rendimento da produção *in vitro*, mesmo com os índices atuais (aproximadamente 30%) de produção de blastocistos. Em muitos laboratórios de pesquisa, esta biotecnologia tem sido utilizada para estudos da maturação, fecundação, regulação do desenvolvimento embrionário inicial, clonagem, bipartição, micro-injeção de DNA exógeno, sexagem e criopreservação de gametas e embriões com objetivo de aumentar a qualidade dos embriões produzidos *in vitro*. Apesar dos avanços obtidos, a produção *in vitro* de embriões ainda apresenta algumas limitações, tais como: baixos índices de blastocistos, dificuldade na criopreservação dos embriões e

menor viabilidade dos oócitos obtidos de fêmeas impúberes em relação aos de vacas.

Para que venha a ser utilizada em larga escala, uma rotina eficiente de produção de embriões *in vitro* deverá ser estabelecida, de modo que embriões de excelente qualidade possam ser oferecidos de forma constante aos produtores interessados e com um menor custo. Porém, alguns pontos ainda não apresentam alta eficiência dentro da cadeia de produção *in vitro* de embriões, dentre eles se destaca a maturação *in vitro*, a qual corresponde a uma série de mudanças nucleares, citoplasmáticas e bioquímicas, necessárias para que o ovócito adquira a plena capacidade de ser fertilizado e desenvolver um novo indivíduo.

Em oócitos de mamíferos, a meiose é interrompida ainda durante o período fetal, na fase de prófase I, permanecendo assim até serem estimulados a retomarem a primeira divisão meiótica, que ocorre antes da ovulação, após o ovócito ter sofrido um extenso crescimento. A primeira etapa da retomada da meiose é a quebra da vesícula germinativa (GVBD), quando os cromossomas condensam-se numa forma compacta. O centrossoma então se divide em dois centríolos, ao redor dos quais aparecem ásteres que se movem separadamente e um feixe de microtúbulos é formado entre eles, formando uma estrutura conhecida como fuso meiótico. Os cromossomas, em pares diplóides, tornam-se arranjados numa placa de feixe equatorial, necessário para a divisão equitativa dessas

estruturas. O ovócito primário sofre duas divisões meióticas. Na primeira divisão, duas células são formadas, mas uma delas contém quase todo o citoplasma; e a outra, muito menor, forma o primeiro corpúsculo polar. A progressão da telófase da primeira divisão meiótica para a extrusão do primeiro corpúsculo polar garante que metade do conteúdo cromossômico seja expelido no espaço perivitelínico, enquanto a outra metade permanece no citoplasma do ovócito. O gameta passa a ser chamado de ovócito secundário e os cromossomos voltam a se alinhar na placa metafásica para que seja eliminada uma das cromátides de cada cromossomo após a segunda meiose. A segunda divisão meiótica começa e progride para a meiose II, mas não é completada até que a penetração espermática ocorra. Assim, a maturação nuclear do ovócito é retomada e finalização da primeira divisão meiótica, subsequente progressão para a meiose II, acompanhada pela maturação citoplasmática que prepara o oócito para a fertilização e desenvolvimento embrionário inicial.

Essas mudanças envolvem um rearranjo estrutural das organelas e grandes mudanças no padrão da síntese de proteínas. Em todas as espécies a maturação ovocitária parece requerer a produção do fator promotor da meiose ou fase M (MPF). O fator promotor da meiose está envolvido na condensação da cromatina, na GVBD e na formação do fuso meiótico. O fator promotor da meiose ativo catalisa a quebra da vesícula germinativa pela indução à dissociação das

moléculas da lâmina, e também fosforila as histonas H1 e proteínas associadas aos microtúbulos.

O fator promotor da meiose é uma proteína serina-treonina quinase composto por uma subunidade catalítica ( $p34^{cdc2}$ ) e uma subunidade regulatória, a ciclina B. Durante o ciclo celular, a atividade do fator promotor da meiose é regulada pela fosforilação-defosforilação da subunidade  $p34^{cdc2}$  e sua associação com a ciclina B. Especificamente, a ativação do fator promotor da meiose envolve a associação da ciclina B e  $p34^{cdc2}$  e seletiva desfosforilação da  $p34^{cdc2}$  em dois resíduos, tirosina 15 (Tyr15) e treonina 14 (Thr14). O fator promotor da meiose e outras ciclinas dependentes de quinases (CDKs), são moléculas chave na regulação da progressão do ciclo celular durante a mitose e a meiose.

A regulação da atividade do fator promotor da meiose é em parte dada pela desfosforilação dos resíduos tirosina 15 e treonina 14 da subunidade  $p34^{cdc2}$  do fator promotor da meiose. A retirada de fosfato desses resíduos é feita pela proteína Cdc25, tornando o fator promotor da meiose ativo, o que leva a retomada da meiose. Cdc25 é uma fosfatase de dupla especificidade, muito conservada em várias espécies. Pela remoção dos fosfatos nos resíduos inibitórios do fator promotor da meiose, a proteína Cdc25 controla a entrada e progressão pelas várias fases do ciclo celular.

A proteína quinase B (PKB) ou Akt, uma proteína que participa da cascata de sinalização pela insulina, ativa a

proteína fosfodiesterase 3A, que transforma AMPc em 5'-AMP, o qual não é capaz de ativar a proteína quinase A (PKA). Estando ativa, a proteína quinase A fosforila resíduos de serina ou treonina da subunidade p34<sup>cdc2</sup> do fator promotor da

5 meiose, deixando-o na sua forma inativa impedindo assim a retomada da meiose. A proteína quinase B e a enzima fosfoinositide 3 kinase (PI3K), ambas participam da cascata de sinalização deflagrada pela insulina, que levará a inibição da enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK3). Uma

10 vez a fosfoinositide 3 kinase inibida, a enzima glicogênio sintase quinase 3 estará ativa. Essa enzima glicogênio sintase quinase 3 já foi descrita como participando de vários processos de sinalização celular, dentre eles estimulando a polarização do embrião (formação do eixo cranial e caudal) e

15 no processo de mitose durante a divisão celular.

Ovários de vacas mestiças cíclicas em idades variadas foram obtidos semanalmente em abatedouros. Após a coleta, foram imediatamente colocados em frascos contendo solução salina e antibiótico. O complexo *cumulus*-oócito (COC) foi

20 aspirado do ovário com seringa e agulha 21G x 11/4" e após a seleção, os complexos *cumulus*-oócito foram lavados 4 vezes em gotas contendo meio de lavagem antes de serem colocados nos meios de maturação. O complexo *cumulus*-oócito foi classificado em 4 categorias de acordo com número de células

25 e aspecto compacto do *cumulus*, além da transparência e

homogeneidade do ooplasma. Somente os complexos *cumulus*-oócito com grau 1 e 2 contendo *cumulus* compacto, e pelo menos três camadas celulares e com citoplasma de aparência homogênea foram utilizados. Estes complexos *cumulus*-oócito  
5 foram lavados por três vezes em meio de lavagem TCM199-HEPES/ soro fetal bovino (SFB) (TCM-199 com 10% soro fetal bovino) e colocados (20 a 30 oócitos) em gotas de 100 µL em placa de Petri de 25 mm, contendo meio de maturação composto de meio de cultivo TCM-199 (Sigma), acrescido de 10% de soro fetal  
10 bovino, 10 µg/ mL de FSH e antibióticos, para o controle e o meio contendo o tratamento com wortmanina foi composto por meio controle acrescido de wortmanina, sendo os meios controle e tratamento cobertos com óleo mineral. A maturação foi realizada em estufa de cultivo em atmosfera umidificada,  
15 com 5% de CO<sub>2</sub> a 38,5°C, durante 22h. Após a maturação, os oócitos foram lavados por três vezes no meio de fertilização Talp-fertilização (Talp-fec) (tabela abaixo), suplementado com 6 mg/ml de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e  
20 transferidos para gotas de 100 µL deste mesmo meio sob óleo mineral em placa de Petri (35 x 10 mm).

Tabela 1: Formula do meio de fertilização Talp-fertilização (Talp-fec)

<i>Reagente</i>	<i>Concentração estoque (mM)</i>	<i>do Quantidade para o meio de uso</i>
água		10 ml
NaCl	114	0,066g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,33	0,0004g
NaHCO <sub>3</sub>	25	0,021g
KCl	3,22	0,0024g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,5	0,001g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,04	0,003g
Ácido Lático 98%	0,01	8.8 µl
vermelho de fenol	0,056	0,0002g
Piruvato de sódio	0,21	0,00022g
Penicilina	100UI/ml	10 µl
Estreptomicina	100µg/ml	
pH	7,2	
Osmolaridade	275-285 mOsm	

A concentração da solução de espermatozóides foi determinada pela contagem dos espermatozóides em uma câmara de Neubauer, a fim de se obter uma concentração espermática final na gota de fertilização de  $2 \times 10^6$  espermatozóides/mL. Os espermatozóides foram incubados juntamente com os oócitos a uma temperatura de 38,5°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 18 h em meio Talp-Fec acrescido de 2 mM de penicilamina, 1 mM

de hipotaurina, 20 µg/mL de heparina e 25 mM de epinefrina. Após este período, os supostos zigotos foram lavados três vezes em meio de cultivo (TCM 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos - 100 UI/mL de penicilina e 5 100 UI/ml de estreptomicina) para remoção das células do *cumulus* e espermatozóides e, em seguida, transferidos para gotas de cultivo de 150 µL do meio de cultivo sob óleo mineral, onde foram mantidos por 7-8 dias a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Após esse período, os 10 blastocistos formados foram contados em lupa e observada uma proporção de 70% de blastocisto formados no tratamento com wortmanina, enquanto que no controle observou-se uma taxa de 33% de blastocistos formados. Essa diferença na taxa de blastocistos formados no tratamento com wortmanina, 15 caracteriza esse inibidor como um potencial suplemento no meio de maturação de oócitos, a fim de se aumentar a taxa de blastocistos obtidos em produção *in vitro* de embriões bovinos.

### REIVINDICAÇÕES

- 1-“ Meio modificado com presença de inibidores de enzima para produção *in vitro* de embriões de mamíferos”, caracterizado pelo fato de consistir em um meio de cultivo contendo um ou  
5 mais inibidores da enzima fosfoinositide 3 quinase.
- 2- Meio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato que conter sais farmacologicamente aceitáveis dos inibidores.
- 3- Meio de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado  
10 pelo fato que o inibidor estar em uma concentração variando de 0,001 nM a 1 mM
- 4- Meio de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato que inclui ainda sais, carboidratos e fatores de crescimento.
- 15 5 - Uso do meio de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizado por ser utilizado no cultivo de embriões de mamíferos.

**RESUMO****MEIO MODIFICADO COM PRESENÇA DE INIBIDORES DE ENZIMA PARA  
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE MAMÍFEROS**

“Meio modificado com presença de inibidores de enzima  
5 para produção *in vitro* de embriões de mamíferos”,  
caracterizado como uma formulação de um meio de cultura  
utilizado no processo de produção *in vitro* de embriões, com  
adição de inibidores da enzima fosfoinositide 3 quinase  
(também conhecida como PI3K ou PI3 quinase). Em concentrações  
10 variando de nanomolar a milimolar, a adição desses inibidores  
no meio para a produção *in vitro* de embriões bovinos promoveu  
uma expressiva elevação da taxa de blastocistos. Foram  
testados vários inibidores sendo que os melhores resultados  
foram obtidos com o uso, mas não somente, do inibidor  
15 wortmanina.