UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

KÁTIA LANCELLOTTI SCHWARZ

**“O óxido nítrico e os nucleotídeos cíclicos em
oócitos bovinos maturados *in vitro*”**

Pirassununga
2011

KÁTIA LANCELLOTTI SCHWARZ

**“O óxido nítrico e os nucleotídeos cíclicos em
oócitos bovinos maturados *in vitro*”**

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para obtenção
do Título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Lima Verde Leal

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

Schwarz, Kátia Lancellotti

O óxido nítrico e os nucleotídeos cíclicos em oócitos
bovinos maturados in vitro"/ Kátia Lancellotti Schwarz

Pirassununga, 2011.

106 f.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Ciências Básicas.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.

Orientador: Profa. Dra. Cláudia Lima Verde Leal

1. Bovinos 2. Maturação 3. oócito

4. óxido nítrico 5. GMPc 6. AMPc. I. Título.

DEDICO:

*Às minhas filhas, Gabriela e
Fernanda, por serem minha eterna
fonte de inspiração, por vocês eu
tenho vontade de continuar e lutar
sempre.*

*Ao meu grande amor, Marcelo, por
nunca permitir que eu enfraqueça diante
dos obstáculos encontrados e sempre
acreditar em minha capacidade, muitas
vezes até mais do que eu mesma.*

*Aos meus pais, com
saudades,
por tudo que
representaram
em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Cláudia Lima Verde Leal**, que se portou como só fazem os mestres. Acreditando no meu trabalho, deu-me a liberdade necessária dividindo comigo as expectativas, conduziu-me a maiores reflexões e desta forma enriqueceu-o, certamente você deu rumo a minha vida profissional. Minha especial admiração e gratidão.

A amiga **Lígia Garcia Mesquita**, pela sua contribuição e interesse carinhoso, do início ao final do estudo, estabelecendo comigo uma aliança que se traduziu numa co-orientação amigável. Meu respeito, admiração e carinho.

A amiga **Fabiane Zaffalon**, pela deliciosa convivência, pelo carinho, atenção e imensa disponibilidade em me ajudar sempre.

Ao amigo **Pedro Ratto** pelas trocas de informações, esforços e discussões para padronização de todas as técnicas utilizadas neste trabalho.

Ao amigo **Marcos Roberto Chiaratti**, pela humildade e disponibilidade em me ajudar, durante as análises de tempo real, reestabelecendo meu interesse nesse estudo.

Ao amigo **Tiago De Bem**, pela gentileza e carinho de sempre.

Ao amigo **Luciano Remy**, que apareceu em minha vida de uma maneira simples, mas foi fundamental, deixando minha rotina laboratorial menos densa e contribuiu um monte para tornar meu sonho do estágio na UCD – Irlanda realidade.

Ao **Prof. Dr. Heidge Fukumasu** pelas correções na qualificação, sempre solícito e com idéias enriquecedoras. Meus sinceros agradecimentos.

Ao **Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles**, por ter me acolhido durante a Iniciação Científica, dando rumo a minha longa jornada científica.

As técnicas de laboratório, **Arina L. Rochetti, Gabriela A. Rizzato, Márcia R.M. Silva e Sílvia S Godoy** pela eficiência, dedicação e simpatia. Meu muito obrigada.

A cada **integrante e ex-integrante do Laboratório de Morfo-fisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) e Histologia Animal**, que tive o prazer e orgulho de trabalhar junto. Muitas pessoas passam pela nossa vida, mas poucas ficam marcadas para sempre por um motivo muito especial, sem vocês nada disso seria possível. Agradeço pelos momentos de convívio, trocas, risos e afeto. Com muitas saudades, obrigada.

À **FAPESP** pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

SCHWARZ, K.L. “O óxido nítrico e os nucleotídeos cíclicos em oócitos de bovinos” (106f). 2011. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga 2011.

O óxido nítrico (NO) é um mensageiro químico gerado pela atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) a qual foi detectada em vários órgãos incluído o sistema reprodutor. O sistema NOS/NO parece desempenhar papel importante na maturação oocitária entre outras funções. No entanto, apesar das evidências, há poucos estudos sobre o papel desse sistema em oócitos da espécie bovina. Sabe-se que o NO atua pela via da guanilato ciclase (GC) estimulando a produção do nucleotídeo GMPc, que por sua vez é capaz de influenciar os níveis de outro nucleotídeo, o AMPc, que é um importante elemento da via de sinalização das gonadotrofinas nos oócitos e no controle da maturação oocitária. O objetivo do presente estudo foi de investigar o envolvimento da via do GMPc na ação do sistema NOS/NO na maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos e seu efeito sobre a via do AMPc. Com a maior concentração estudada do doador de NO (10^{-7} M de SNAP), apenas 36% dos oócitos conseguiram alcançar o estágio de RVG ($P < 0,05$), após 9 horas de maturação. Esse atraso também foi observado com diferentes concentrações do estimulador de GC (5, 10 ou 50 μ M de Protoporfirina IX) e pelo análogo de GMPc (1, 2 e 4mM de 8-Br-GMPc), que apresentaram uma taxa média de RVG de 50% para os tratamentos e 70% para os grupos controles sem as drogas ($P < 0,05$). No início da maturação (0h), os níveis de GMPc foram de 5,29 pmol/oócito sofrendo uma queda logo na primeira hora de cultivo para 2,97 pmol nos oócitos do grupo controle e 1,54 pmol nos cultivados com associação de 10^{-7} M de SNAP (doador de NO) e 100 μ M de OQD (inibidor de GC ($P < 0,05$)). No grupo de oócitos cultivados apenas com SNAP, os níveis de GMPc se mantiveram em 4,51 pmol/oócito, semelhante ao grupo imaturo (0h de cultivo, $P > 0,05$). O doador de NO manteve estável o nível de GMPc somente na primeira hora de maturação. Após 3 e 6 h de MIV, os níveis de GMPc permaneceram baixos e similares (0,07 a 2,46 pmol/oócito, $P > 0,05$) nos grupos controle (sem drogas), tratado com doador de NO (10^{-7} M de SNAP) associado ou não ao inibidor de guanilato ciclase (100 μ M de OQD). Também foi observada uma queda nos níveis de AMPc em relação ao grupo imaturo (32,42 fmol de AMPc/oócito) para os demais grupos ($P < 0,05$), que apresentaram aproximadamente, 12,0 a 16,0 fmol de AMPc/oócito durante a primeira hora, 3,3 a 8,0 fmol/oócito durante a terceira hora e 7,4 a 18,3 durante a sexta hora de maturação ($P > 0,05$). O NO afetou os níveis de GMPc no início da maturação, mas não os níveis de AMPc. O NO e o GMPc podem atuar no controle da expressão gênica de uma

série de proteínas envolvidas no controle dos níveis de AMPc e GMPc ou suas funções. Esse controle pode ser efeito direto do NO (PKG2, PDE3A, PDE4D e PDE8A), do GMPc (ADCY6) ou do NO via GMPc (PKA1) e varia com o compartimento considerado (oócito ou células do cumulus). Esses resultados demonstraram a inter-relação das vias NO/GMPc/AMPc e toda a sua complexidade dependendo do tipo celular e da fase da maturação de oócitos bovinos.

Palavras-chave: oócito bovino, maturação *in vitro*, óxido nítrico, meiose, AMPc, GMPc e SNAP.

ABSTRACT

The NOS/NO system seems to play an important role in oocyte maturation besides other functions. However, despite the evidence, there are few studies on the possible role of this system in bovine oocytes. It is known that NO acts via guanylate cyclase (GC) by stimulating the production of the nucleotide cGMP, which in turn can influence the levels of another nucleotide, cAMP, which is an important element of the signaling pathway of gonadotropins in oocytes and in the control of oocyte maturation. The aim of the present study was to investigate the involvement of the cGMP pathway in the action of the NOS/NO system on the *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes and its effect on the cAMP pathway. The highest studied concentration of the NO donor (10^{-7} M SNAP), only 36% of oocytes were able to undergo GVBD ($P < 0.05$) after 9 hours of maturation. This delay was also observed with different concentrations of the GC stimulator (5, 10 or 50 μ M Protoporphirin IX) and the cGMP analogue (1, 2 and 4 mM 8-Br-cGMP), which had an average of 50% GVBD for treatment groups and 70% for control groups without drugs ($P < 0.05$). At the beginning of maturation (0 h) cGMP levels were 5.29 pmol/oocyte and decreased within the first hour of culture to 2.97 pmol and 1.54 pmol in the control group and in oocytes cultured in 10^{-7} M SNAP (NO donor) associated with 100 μ M OQD (GC inhibitor; $P < 0.05$). In the group of oocytes cultured only with SNAP, cGMP levels remained at 4.51 pmol/oocyte similar to the immature group (0 h culture, $P > 0.05$). The increase of NO maintained cGMP levels stable only during the first hours of maturation. After 3 and 6 h IVM, cGMP levels remained low and similar (0.01 to 2.5 pmol/ oocyte, $P > 0.05$) in control (without drugs), treated with NO donor (SNAP 10^{-7} M) with or without the guanylate cyclase inhibitor (100 μ M OQD). A decrease in cAMP levels was also observed when compared with the immature group (32.42 fmol cAMP/oocyte) for the other groups ($P < 0.05$), which showed 12.0 to 16.0 fmol cAMP/oocyte after the first hour, 3.3 to 8.0 fmol/oocyte after the third hour and 7.4 to 18.3 after the sixth hour of IVM ($P > 0.05$). NO and cGMP may act to control gene expression in a series of proteins involved in control of the

levels of cAMP and cGMP or their functions. The control may be a direct effect of NO (PKG2, PDE3, PDE4D and PDE8A), cGMP (ADCY6) or NO via cGMP (PKA1) and varies with the compartment considered (oocyte or cumulus cells). The results showed the interrelationship of the NO/cGMP/cAMP pathway and all its complexity depending on the cell type and the stage of maturation in bovine oocytes.

Keywords: bovine oocyte, *in vitro* maturation, nitric oxide, meiosis, cAMP, cGMP and SNAP.

LISTA DE FIGURAS

- Figura II.1** Regulação dos níveis de GMPc e AMPc e entrelaçamento das vias. Estão mostradas apenas as fosfodiesterases (PDE) que já foram identificadas em oocistos e/ou células da granulosa. A guanilato ciclase (GC) promove a síntese de GMPc e a adenilato ciclase (AC) a de AMPc. As PDE5 e PDE6 são responsáveis pela degradação do GMPc enquanto as PDE3 e PDE4 degradam o AMPc. O GMPc, por sua vez, é capaz de inibir a PDE3, resultando no aumento dos níveis de AMP 11
- Figura II.2** Via de sinalização da NOS pelo GMPc. NOS, enzima óxido nítrico sintase 2, responsável pela síntese de óxido nítrico (NO); GC, enzima guanilato ciclase ativada por NO e responsável pela síntese de GMPc; GMPc, nucleotídeo cíclico capaz de ativar canais iônicos, proteína cinase dependente de GMPc (PKG) e fosfodiesterases (PDEs) GMPc específicas 16
- Figura III.1** Grupos de 23 oócitos por tratamento, foram distribuídos em microgotas de meio de cultivo indefinido (fase I: com a presença de SFB e hormônios) e semi-definido (fase II: sem SFB e hormônios), acrescido ou não das respectivas drogas e avaliados no início (RVG: 7 e 9 horas de MIV) e no final da maturação (MII: 24 horas de MIV). O grupo controle foi cultivado no meio sem as drogas e todos os ensaios de dose-resposta foram realizados em 4 repetições 18
- Figura III.2:** Os níveis de GMPc e AMPc foram mensurados em grupos de oócitos imaturos (0 hora) e maturados na presença do doador de NO isolado (10^{-7} M de SNAP) ou associado com o inibidor de GC ($+ 10^{-7}$ M de SNAP $+ 100\mu$ M de OQD), durante 1, 3 e 6 horas de maturação. Para cada um dos três momentos de coleta foi cultivado um grupo controle que permaneceu apenas em meio B199, sem a suplementação de hormônios ou soro e sem o acréscimo das drogas. Foram utilizados pools de 30 oócitos para cada tratamento avaliado por imunoenensaio para mensuração do GMPc e 10 oócitos para o de AMPc. Foram realizadas 4 repetições por nucleotídeo e por cada tempo de cultivo de maturação 19

Figura III.3: Pools de 22 CCOs foram maturados por 24 horas para cada tratamento. Após esse período foi feita a separação das células do *cumulus* e oócito, possibilitando a avaliação dos transcritos por compartimento celular. Para cada gene alvo analisado foram avaliados simultaneamente os controles endógenos (ACTB e PPIA) de cada amostra em cada tratamento, por 4 repetições e em duplicatas. As duplicatas foram feitas em placas separadas a fim de se apurar a precisão dos resultados e levou-se em consideração a temperatura de anelamento de cada gene. A proporção dos genes transcritos foram avaliadas em relação aos grupos imaturos (0 hora de desenvolvimento). Os genes circulados em vermelho, correspondem à via GMPc e os genes circulados em verde, correspondem à via AMPc 20

Figura IV.1: Procedimento para fixação e coloração de oócitos (esquema desenvolvido por Adona, 2006) 25

Figura IV.2: Oócitos em estágio de vesícula germinativa (A) e metáfase I (B). O RVG (rompimento da vesícula germinativa) é considerado a partir do momento em que não é mais possível visualizar a membrana nuclear indicada pela seta. . 25

Figura IV.3. Oócitos em estágio de metáfase I/ anáfase I (A), anáfase I/telófase I (B); C) metáfase II (C). A seta vermelha indica a placa metafásica e a seta azul o 1º corpúsculo polar 26

Figura IV.4. Em 1, 2 e 3, exemplos de amostras de RNA preservadas e em 4 uma amostra de RNA degradada. 29

Figura IV.5 Curva padrão de amplificação para o gene ACTB por PCR em tempo real para oócitos maturados em diluições 1:1. 31

Figura IV.6: Em A e B: Exemplo do cálculo de eficiência dos genes ACTB e NOS2 baseado no *slope*. C: Diferença de CT dos dois genes em estudo para a validação da comparação relativa entre ambos. 32

Figura V.1: Taxa de quebra da vesícula germinativa em oócitos de bovinos avaliados com 7 horas de desenvolvimento em meio indefinido (com a presença de SFB e

hormônios – fase1) e avaliados com 9 horas de maturação em meio semi-definido (sem a presença de soro ou de hormônios – fase 2).....	45
Figura V.2: Representação gráfica dos níveis de GMPc às 0, 1, 3 e 6 horas de maturação <i>in vitro</i> . (* diferença em relação à 0h, P<0,05).	49
Figura V.3 Representação gráfica da queda do AMPc, durante o período de 0, 1, 3 e 6 horas de cultivo * 0h foi diferente de todos os outros grupos, P<0,05).	50
Figura V.4 Abundância relativa de transcritos das enzimas óxido nítrico sintase induzível (NOS2) e endotelial (NOS3) em oócitos e em células do <i>cumulus</i> do mesmo pool do complexo <i>cumulus</i> oócitos (CCO) após 24h de MIV com ou sem SNAP (10^{-7} M) e/ou OQD (100µM). Diferenças significativas representadas por letras diferentes (P<0,05).	52
Figura V.5 Abundância relativa de transcritos do componente da enzima guanilato ciclase (GUCY1B3) em oócitos e células do <i>cumulus</i> do mesmo pool do complexo <i>cumulus</i> oócitos (CCO) após 24h de MIV com ou sem SNAP (10^{-7} M) e/ou OQD (100µM). Diferenças significativas (P<0,05) estão representadas por letras diferentes.	53
Figura V.6 Abundância relativa de transcritos da enzima fosfodiesterase 5A (PDE5A) em oócitos e células do <i>cumulus</i> do mesmo pool do complexo <i>cumulus</i> oócitos (CCO) após 24h de MIV com ou sem SNAP (10^{-7} M) e/ou OQD (100µM). Não houve diferença entre os grupos (P>0,05).	54
Figura V.7 Abundância relativa de transcritos da enzima proteína cinase dependente de GMP (PKG1) em oócitos e células do <i>cumulus</i> do mesmo pool do complexo <i>cumulus</i> oócitos (CCO) após 24h de MIV com ou sem SNAP (10^{-7} M) e/ou OQD (100µM). Diferenças significativas (P<0,05) estão representadas por letras diferentes.	55
Figura V.8 Abundância relativa de transcritos da enzima adenilato ciclase, isoforma 6 (ADCY6) em oócitos e células do <i>cumulus</i> do mesmo pool do complexo <i>cumulus</i> oócitos (CCO) após 24h de MIV com ou sem SNAP (10^{-7} M) e/ou OQD	

(100µM). Diferenças significativas, representadas por letras diferentes (P<0,05). 55

Figura V.9 Abundância relativa de transcritos das enzimas fosfodiesterase isoforma 3A (PDE3A) e 4D (PDE4D) em oócitos e células do cumulus do mesmo pool do complexo cumulus-oócito (CCO) após 24h de MIV com ou sem SNAP (10^{-7} M) e/ou OQD (100µM). Diferenças significativas, representadas por letras diferentes (P<0,05). 56

Figura V.10 Expressão relativa das enzimas fosfodiesterase 8 (PDE8A) em oócitos e células do *cumulus* do mesmo pool do complexo *cumulus* oócitos (CCO) após 24h de MIV com ou sem SNAP (10^{-7} M) e/ou OQD (100µM). Diferenças significativas, representadas por letras diferentes (P<0,05). 57

Figura V.11 Expressão relativa da proteína cinase dependente de AMPc (PKA) em oócitos e células do *cumulus* do mesmo pool do complexo *cumulus* oócitos (CCO) após 24h de MIV com ou sem SNAP (10^{-7} M) e/ou OQD (100µM). Diferenças significativas, representadas por letras diferentes (P<0,05). 57

LISTA DE TABELAS

Tabela IV.1	Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados para quantificação relativa dos genes selecionados	28
Tabela V.1:	Proporção de oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i> com diferentes concentrações do doador de óxido nítrico (SNAP) que romperam a vesícula germinativa (RVG) após 7h de maturação.....	34
Tabela V.2:	Maturação nuclear de oócitos bovinos submetidos à maturação <i>in vitro</i> por 24h na presença de diferentes concentrações de SNAP	35
Tabela V.3:	Maturação nuclear de oócitos bovinos submetidos à maturação <i>in vitro</i> por 24h na presença de diferentes concentrações de OQD	36
Tabela V.4:	Maturação nuclear de oócitos bovinos submetidos à maturação <i>in vitro</i> por 24h na presença de diferentes concentrações de Protoporfirina IX	37
Tabela V.5:	Maturação nuclear de oócitos submetidos à maturação <i>in vitro</i> por 24h na presença de diferentes concentrações de 8-Br-GMPc.....	37
Tabela V.6:	Maturação nuclear de oócitos submetidos à maturação <i>in vitro</i> por 24h na presença de diferentes concentrações de KT5823	38
Tabela V.7:	Maturação nuclear de oócitos submetidos à maturação <i>in vitro</i> por 24h em meio semi-definido na presença de diferentes concentrações de 8-Br-GMPc (análogo de GMPc)	39
Tabela V.8:	Maturação nuclear de oócitos submetidos à maturação <i>in vitro</i> por 24h em meio semi-definido na presença de diferentes concentrações de KT5823 (inibidor de PKG)	40

Tabela V.9: Maturação nuclear de oócitos submetidos à maturação <i>in vitro</i> por 24h em meio semi-definido na presença de concentrações mais elevadas de KT5823 (inibidor de PKG)	41
Tabela V.10: Maturação nuclear de oócitos bovinos submetidos à maturação <i>in vitro</i> por 24h em meio semi-definido na presença de diferentes concentrações de OQD (inibidor de GC)	42
Tabela V.11: Maturação nuclear de oócitos submetidos à maturação <i>in vitro</i> 24h em meio semi-definido na presença de altas concentrações de KT5823 e de OQD.	43
Tabela V.12: Taxa de rompimento da vesícula germinativa (RVG) após 9 h de maturação <i>in vitro</i> com diferentes concentrações do doador de óxido nítrico (SNAP).	44
Tabela V.13: Taxa de rompimento da vesícula germinativa (RVG) após 9 h de maturação em oócitos bovinos cultivados <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de Protoporfirina IX (estimulador de GC) em meio semi-definido.	46
Tabela V.14: Taxa de rompimento da vesícula germinativa (RVG) após 9 h de maturação em oócitos bovinos cultivados <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de 8-Br-GMPc (análogo de GMPc) em meio semi-definido	47
Tabela V.15: Mensuração dos níveis de GMPc em oócitos de bovinos cultivados com 10^{-7} M de SNAP (doador de NO) e 100µM de OQD (inibidor de GC) em diferentes tempos de maturação.....	48
Tabela V.16: Mensuração dos níveis de AMPc em oócitos de bovinos cultivados com 10^{-7} M de SNAP (doador de NO) e 100µM de OQD (inibidor de GC) com diferentes tempos de maturação	50
Tabela V.17: Resumo dos resultados das vias que possam estar influenciando a transcrição dos genes alvos estudados nos oócitos e células do cumulus maturados <i>in vitro</i>	58

Tabela V.18: Resumo dos genes cuja abundância relativa foi afetada pelas vias estudadas nos oócitos e células do cumulus maturados in vitro em função do tratamento utilizado 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1°CP	1° corpúsculo polar.
8-Br-GMPc	8 Bromo - Guanosina 3'5'-monofosfato cíclica
AC	Adenilato ciclase
ADCY6	Adenilato ciclase 6
AI	Anáfase I
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ATP	adenosina trifosfato
B199	TCM199, sais de Earle e 20mM de bicarbonato de sódio
BSA	albumina sérica bovina
CDK	cinase dependente de ciclina
CCOs	complexos <i>cumulus</i> -oócito
CO₂	Dióxido de carbono
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	Ácido deoxiribonucleíco
DNAc	DNA complementar
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GC	Guanilato ciclase
GJ	<i>Gaps junctions</i> (junções comunicantes)
GMPc	Guanosina 3'5'-monofosfato cíclica
GUCY1B3	Guanilato ciclase 1, beta 3 solúvel
GTP	Guanosina trifosfato
H199	sais de Earle e 20mM de bicarbonato de sódio e 25 mM de Hepes
LH	Hormônio luteinizante
L-NAME	Nw-nitro-L-arginina metil éster
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MPF	Fator promotor da maturação
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS1	Óxido nítrico sintase neuronal

NOS2	Óxido nítrico sintase induzível
NOS3	Óxido nítrico sintase endotelial
O₂	oxigênio
OQD	1H- [1,2,4] oxadiazolo [4,3a] quinoxaline-1-one
PB	Pares de base
PBS	solução salina fosfatada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDE	Fosfodiesterase com diferentes isoformas
PIV	Produção in vitro
PKA	Proteína cinase dependente de AMPc
PKG	Proteína cinase dependente de GMPc
PVA	Álcool polivinílico
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RVG	Rompimento da vesícula germinativa
SFB	Soro fetal bovino
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicilamina
SNP	Nitroprussiato de sódio
TCM199	Meio de cultura de tecidos
TI	Telófase I
VG	Vesícula germinativa

SUMÁRIO

CAPÍTULO I:

1. Introdução.....	2
1.1. Justificativa.....	3
1.2. Hipótese.....	3
1.3. Objetivos	3
1.3.1. Objetivo Geral.....	3
1.3.2. Objetivos Específicos	3

CAPÍTULO II

2. Revisão de Literatura.....	6
2.1. Maturação Oocitária	6
2.1.1. Maturação Nuclear..	6
2.1.2. Maturação Citoplasmática	6
2.2. Controle da Maturação	8
2.2.1. Os Nucleotídeos Cíclicos.....	8
2.2.2. As Fosfodiesterases.	10
2.3. Óxido Nítrico.....	12
2.3.1 Óxido Nítrico na Reprodução.....	13
2.3.2. Óxido Nítrico na Maturação Oocitária	14
2.3.3. Via de Sinalização do Óxido Nítrico.....	15

CAPÍTULO III:

3. Delineamento Experimental.....	18
3.1 Efeito do aumento de NO e da manipulação da atividade de componentes da via GC/GMPc sobre a maturação nuclear.....	18
3.2 Mensuração de GMPc e AMPc em oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i>	19
3.3 Efeito do SNAP (doador de NO) associado ou não ao OQD (inibidor da GC) na abundância relativa de transcritos dos componentes da via do GMPc (NOS2, NOS3, GUCY1B3, PKG2 e PDE5A) e AMPc (ADCY6, PKA1, PDE3A, PDE4D e PDE8A)) em oócitos e células do cumulus.....	20

CAPÍTULO IV

4. Material e Métodos	22
4.1. Local do Experimento.....	22
4.2. Obtenção de complexos cumulus-oócitos.....	22

4.3. <i>Maturação in vitro</i>	22
4.4. <i>Determinação do estágio da meiose dos oócitos</i>	24
4.5. <i>Mensuração dos níveis intracelulares dos nucleotídeos GMPc e AMPc</i>	26
4.6. <i>Congelamento e armazenamento dos CCOs para análise dos transcritos por PCR</i>	27
4.7. <i>Desenho de primers</i>	27
4.8. <i>Extração de RNA total</i>	29
4.9. <i>Transcrição reversa</i>	29
4.10. <i>Pré-amplificação</i>	30
4.11. <i>PCR em tempo real</i>	30
4.11.1. <i>Análise dos dados do PCR</i>	31
4.12. <i>Análise estatística</i>	32

CAPÍTULO V:

5. <i>Resultados</i>	34
5.1. <i>Influência do NO sobre o rompimento da vesícula germinativa</i>	34
5.2. <i>Influência do NO sobre maturação nuclear</i>	35
5.3. <i>Influência do OQD (inibidor de guanilato ciclase) sobre a maturação nuclear</i>	35
5.4. <i>Influência da Protoporfirina IX (estimuladora da guanilato ciclase) sobre a maturação nuclear</i>	36
5.5. <i>Influência do 8-Br-GMPc (análogo do GMPc) sobre a maturação nuclear</i>	37
5.6. <i>Influência do KT5823 (inibidor de PKG) sobre a maturação nuclear</i>	38
5.7. <i>Efeito do análogo de GMPc (8-Br-GMPc) sobre a maturação nuclear em meio semi-definido</i>	39
5.8. <i>Efeito do inibidor de PKG (KT5823) sobre a maturação nuclear em meio semi-definido</i>	39
5.9. <i>Efeito de maiores concentrações do inibidor de GC (OQD) sobre a mat. nuclear em meio semi-definido</i>	41
5.10. <i>Efeito de super dosagens do inibidor de PKG (KT5823) e de GC (OQD) sobre a maturação nuclear em meio semi-definido</i>	42
5.11. <i>Influência do NO sobre o rompimento da vesícula germinativa em meio semi-definido às 9 h de maturação</i>	44
5.12. <i>Efeito do estimulador de GC (Protoporfirina IX) e do análogo de GMPc (8-Br-GMPc) sobre a retomada da meiose em meio semi-definido</i>	45

5.13 Mensuração de GMPc e AMPc em oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i>	47
5.14 Efeito do SNAP (doador de NO) e do OQD (inibidor da GC) na abundância relativa de transcritos dos componentes da via do GMPc (NOS2, NOS3, GUCY1B3, PKG2 e PDE5A) e AMPc (ADCY6, PKA1, PDE3A, PDE4D e PDE8A) em oócitos e células do cumulus.....	51

CAPÍTULO VI:

6. Resumo dos Resultados.....	63
-------------------------------	----

CAPÍTULO VII:

7. Discussão.....	67
-------------------	----

CAPÍTULO VIII:

8. Conclusões.....	77
--------------------	----

CAPÍTULO IX:

9. Referências Bibliográficas.....	79
------------------------------------	----

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O óxido nítrico (NO) é um mensageiro químico detectado em vários tipos celulares como células endoteliais, neurônios e macrófagos, desempenhando também funções variadas como vasodilatação, neurotransmissão e indução de morte celular.

Sua produção se deve à atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) que converte a arginina em citrulina + NO. A NOS pode ser encontrada em 3 isoformas: a forma neuronal (NOS1), a forma induzível (NOS2) e a forma endotelial (NOS3). As NOS 1 e a 3 são isoformas constitutivas com atuação dependente de cálcio e calmodulina e geram NO normalmente em baixas concentrações e de forma breve. A NOS2 é a isoforma que é ativada de forma independente do cálcio mediante estímulos adequados gerando NO em quantidades mais elevadas e por períodos mais longos.

Na esfera reprodutiva, a NOS foi identificada em vários órgãos como ovário, tuba, útero e embriões e tem sido relacionada a diversas funções reprodutivas como desenvolvimento folicular, maturação oocitária e reação acrossômica. Embora essa enzima tenha sido detectada em órgãos do sistema reprodutor de várias espécies, o seu papel na função reprodutiva ainda tem sido pouco investigado.

Em estudos anteriores, evidenciamos a detecção da proteína NOS3 em tecido ovariano bovino e em oócitos bovinos imaturos e maturados *in vitro* e também observamos que a manipulação dos níveis de NO durante a maturação *in vitro* afeta as taxas de maturação e a apoptose em blastocistos produzidos *in vitro* (NATORI *et al*, 2005, SCHWARZ 2007 e 2010, ADONA *et al*, 2007). O NO desencadeia a ativação da enzima guanilato ciclase (GC) resultando na produção do GMPc que atua como segundo mensageiro dessa via de sinalização celular. O GMPc por sua vez é capaz de atuar sobre uma série de fosfodiesterases, enzimas responsáveis pela degradação de outro nucleotídeo, o AMPc. Esse nucleotídeo, por sua vez, produzido pela ação da adenilato ciclase (AC), é um dos principais responsáveis pelo controle da maturação meiótica de oócitos, sendo um segundo mensageiro da via de sinalização das gonadotrofinas sobre o tecido ovariano.

Considerando que o NO pode influenciar a maturação de oócitos bovinos e que uma de suas principais vias de sinalização envolve o GMPc, propomos neste estudo investigar o envolvimento dessa via de sinalização na maturação *in vitro* de oócitos bovinos e sua possível influência sobre a via do AMPc.

1.1 JUSTIFICATIVA

A quantidade e qualidade de embriões produzidos *in vitro* vêm sendo objeto de estudo de inúmeras pesquisas. Porém, apesar do progresso realizado na otimização dos sistemas de cultura para a maturação, fertilização e produção de embrião *in vitro*, apenas 40% dos oócitos obtidos de ovários de abatedouros alcançam o estágio de desenvolvimento até blastocisto. Estas baixas taxas são influenciadas por vários fatores que atuam durante a maturação, fertilização e cultura *in vitro*.

Um desses fatores é a condição de cultivo, que exerce forte influência durante a maturação nuclear e citoplasmática. Visto que a maturação completa é essencial para o desenvolvimento embrionário, um dos caminhos para se tentar aumentar o número e a qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro* é a realização de estudos mais aprofundados das substâncias adicionadas no meio de maturação e seu mecanismo de ação.

1.2 HIPÓTESE

O óxido nítrico interfere no controle da meiose de oócitos bovinos e uma variação na quantidade dessa molécula altera o tempo de retorno e progressão da maturação *in vitro*. Esse efeito ocorre via GC/GMPc, gerando uma interferência no nível de AMPc.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral:

Averiguar a influência do NO sobre a via GMPc e AMPc na maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

1.3.2 Objetivos Específicos:

Como objetivos específicos o presente trabalho buscou estudar os efeitos de:

- diferentes concentrações do doador de NO (SNAP) sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos submetidos à MIV;
- diferentes inibidores (OQD e KT5823) e estimuladores (8-Br-GMPc e Protoporfirina IX) da via GC/GMPc na maturação nuclear de oócitos bovinos submetidos à MIV;

- SNAP associado ou não a um inibidor da GC (OQD) sobre os níveis de GMPc e AMPc nos oócitos e
- SNAP associado ou não a um inibidor da GC (OQD) na abundância relativa de transcritos dos componentes da via do GMPc (GUCY1B3 , PDE5A e PKG2) e AMPc (ADCY6, PKA1, PDE3A, PDE4D, PDE8A e PDE8B) em oócitos e células do *cumulus*.

CAPÍTULO II

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MATURAÇÃO OOCITÁRIA

A maturação do oócito inicia-se logo após o pico ovulatório de LH quando o oócito retoma a meiose e passa pelas modificações finais que o tornam apto a ser fecundado por um espermatozóide. Essa fase abrange a maturação nuclear e citoplasmática.

2.1.1 MATURAÇÃO NUCLEAR

A maturação nuclear compreende o processo de reversão do primeiro bloqueio meiótico do oócito em vesícula germinativa (VG) até o segundo bloqueio meiótico em metáfase II (MII). Inicia-se no momento em que ocorre a retomada da meiose a partir do estágio de diplóteno da prófase I, marcada pela condensação dos cromossomos e rompimento da vesícula germinativa (RVG), ou seja, do envelope nuclear. Após o RVG, o oócito passa pelo estágio de diacinese, metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI), completando a primeira divisão meiótica, e então, rapidamente, passa para a MII da segunda divisão meiótica, quando bloqueia novamente o ciclo celular (segundo bloqueio meiótico). Ao longo desse processo, os cromossomos homólogos ($2n$) são divididos em dois grupos, com a metade do número original de cromossomos. Ao término da primeira divisão meiótica, o citoplasma é dividido assimetricamente (CAN et al. 2003), gerando duas células de tamanhos diferentes: uma pequena chamada de corpúsculo polar e outra grande, oócito secundário. Cada uma das células contém a metade do número de cromossomos da espécie. Ao término da maturação nuclear o oócito permanece nesse estágio do ciclo celular (MII) até a fecundação (MAYES; SIRARD, 2001) ou ativação partenogenética (YI; PARK, 2005).

2.1.2 MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA

Além da progressão da meiose, que caracteriza morfológicamente a maturação do oócito e que por si só não garante o desenvolvimento embrionário futuro, o mesmo sofre modificações em seu citoplasma denominadas maturação citoplasmática.

A maturação citoplasmática compreende as mudanças ultra-estruturais e moleculares que ocorrem no citoplasma do oócito em estágio de VG até o fim da MII. A avaliação dessa maturação pode ser feita indiretamente pela habilidade do oócito maduro em clivar e desenvolver-se a blastocisto após fecundação ou ativação partenogenética.

Outros parâmetros morfológicos indiretos como a expansão das células do *cumulus* (CC), a velocidade de extrusão do primeiro corpúsculo polar e aumento do espaço perivitelínico, também podem ser utilizados para avaliação da maturação citoplasmática (KRUIP et al. 1983).

As modificações ultra-estruturais dizem respeito a uma reorganização citoplasmática, em que a maioria das organelas migra pelos microtúbulos e microfilamentos. As mitocôndrias e o complexo de Golgi, que se localizam mais periféricamente no oócito imaturo, migram e se distribuem numa posição peri-nuclear. Os grânulos corticais, originados do complexo de Golgi e situados originalmente no centro do oócito, migram para periferia do mesmo e ancoram-se logo abaixo da membrana plasmática (CRAN; ESPER, 1990).

As mudanças moleculares também são necessárias para que os oócitos possam prosseguir pelo processo de maturação. Os mecanismos de controle molecular do desenvolvimento de oócitos envolvem desde a seleção de oócitos primários destinados à maturação, ovulação e a conclusão do ciclo de divisão meiótica. Esses mecanismos parecem se diferenciarem de espécie para espécie, existindo diferentes caminhos para regulação, como alterações no nível de AMPc, cálcio e níveis de fosforilações (HEIKINHEIMO et al. 1998).

A quantidade de RNA e proteína presente em um oócito é 50 a 60 vezes maior, comparado a uma célula somática. O maior nível de transcrição ocorre na fase de VG, antes da condensação da cromatina e declina até a fase de MII (TOMEK et al. 2002). O RNAm transcrito durante esse período se mantém estocado até que ocorra a sinalização para sua tradução, que é gerada durante a maturação e o desenvolvimento embrionário inicial (FULKA-JR, et al., 1998). O período de maior síntese de proteínas em bovinos coincide com o período de RVG, após 6 a 10 horas de maturação. Nos oócitos, ao contrário das células somáticas, são necessários processos diferenciados que regulam a tradução durante a maturação meiótica, pois embora a proteção do RNAm por poliadenilação continue até MII, a tradução é mais baixa se comparada ao estágio de RVG (TOMEK et al. 2002).

O tempo de ativação do genoma embrionário com a iniciação de síntese de RNA pelo embrião e conseqüente transição do controle materno para o embrionário varia em diferentes espécies. Em ratos a expressão gênica embrionária ocorre no estágio de 2-células, em suínos e bovinos por volta do estágio de 8 para 16 células (TELFORD et al. 1990) e em humanos, no estágio de 4 para 8 células (HEIKINHEIMO et al. 1998).

2.2 CONTROLE DA MATURAÇÃO OOCITÁRIA

MPF e MAPK

Dentre as proteínas mais importantes que regulam o mecanismo de maturação estão as do complexo MPF (do inglês, *maturation promoting factor*) e as proteínas da família MAPK (do inglês, *mitogen activated protein kinase*); (SHENG et al. 2002).

O MPF (fator promotor da maturação) é um dos principais reguladores das alterações morfológicas que ocorrem durante a maturação do oócito, regulando a condensação dos cromossomos, o rompimento do envelope nuclear e a reorganização dos microtúbulos (KIM et al, 2000). Em oócitos em estágio de VG (imaturos), o MPF mantém-se com baixa atividade. Na retomada da meiose, este se torna ativo atingindo máxima atividade em MI. Sofre depois um declínio transitório entre MI e MII e nessa última fase mantém-se novamente em atividade máxima (MOTLIK et al. 1998). Sua inativação em oócitos em estágio de MII é induzida pela fecundação ou ativação paternogenética e é necessária para que ocorra o desbloqueio da meiose e sua conclusão (TAIEB et al. 1997).

O que desencadeia a ativação do MPF, que caracteriza bioquimicamente a retomada da meiose e, conseqüentemente, o início da maturação, parece ser a concentração de AMPc no complexo *cumulus*-oócito. Quando há uma redução dos níveis de AMPc, finda a inibição sobre a atividade do MPF (GOREN; DEKEL, 1994). Uma vez ativo, o MPF desencadeia os eventos observados na maturação nuclear: quebra da VG, condensação dos cromossomos, formação do fuso meiótico e extrusão do 1º corpúsculo polar.

A via MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno) também é ativada universalmente durante a maturação meiótica. Atua na fosforilação de diversos substratos incluindo fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto (ROUX; BLENIS, 2004). Em oócitos de bovinos sua ativação ocorre com a proximidade do rompimento da VG, apresentando um aumento gradual até 12-14 horas e se mantém estável até o final da maturação. Isso sugere que a MAPK não é requerida para o reinício da meiose, mas é essencial em eventos pós-rompimento da VG (KUBELKA et al. 2000).

2.2.1 OS NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS

Momentos antes do pico de LH, o oócito que atingiu seu tamanho completo adquire habilidade para iniciar a maturação. A aquisição da competência meiótica normalmente ocorre ao mesmo tempo em que o antro folicular é formado e corresponde ao ponto no qual o oócito adquire um nível de proteínas promotoras da maturação, componentes do MPF,

como a CDK1 (cinase dependente de ciclina) e subunidades regulatórias (ciclina) (KANATSU-SHINOHARA et al. 2000).

Também é bem estabelecido que o bloqueio meiótico seja regulado por níveis de AMPc dentro dos oócitos (EPPIG et al. 2004). Uma hipótese para explicar como os níveis de AMPc são mantidos altos é que o próprio oócito poderia estar produzindo seu próprio AMPc a partir de um receptor para proteína G na membrana plasmática, que estimula a Gs, uma proteína estimulatória ligada à proteína G, a ativar constitutivamente a adenilato ciclase (AC) (MEHLMANN et al. 2002; 2004). A transferência de AMPc das células do *cumulus* ao oócito via *gap junctions* também poderia contribuir para a manutenção de altos níveis de AMPc no oócito, mantendo o bloqueio meiótico (WEBB et al. 2002).

A interrupção da comunicação *cumulus*-oócito após estímulo pelas gonadotrofinas, pode levar à diminuição da concentração de AMPc no interior do oócito, podendo assim ocorrer a retomada da meiose, mostrando que o AMPc funciona como regulador da maturação nuclear em oócitos de mamíferos (BILLIG et al. 1988). A queda da concentração de AMPc é de grande importância para a maturação do oócito, pois leva à diminuição da fosforilação de certas proteínas, pela ação da proteína cinase dependente de AMPc (PKA).

Uma vez ativa, a PKA fosforila resíduos de serina ou treonina do fator promotor da maturação (MPF), deixando-o na sua forma inativa, impedindo assim a retomada da meiose (SIRARD et al. 1998). A inativação da PKA em oócitos ativa a fosfatase CDC25B (SOLC et al., 2008), a qual vai desfosforilar a ciclina dependente de cinase 1 (CDK1), a subunidade catalítica do fator promotor da maturação (MPF), induzindo a retomada da meiose (HAN e CONTI, 2006).

Os níveis de AMPc são balanceados entre a síntese pela adenilato ciclase (AC) e degradação pelas fosfodiesterases (PDEs) (LAFOREST et al, 2005). Recentes estudos têm identificado dez isoformas de AC, expressas em diferentes tecidos. Em bovinos não existe relatos das isoformas específicas em oócitos, mas no RNAm das células da granulosa foram expressas as isoformas 3, 4, 6, 8 e nas células do *cumulus* as isoformas 1, 3, 4, 6 e 9 (LASTRO et al, 2006).

Outro mensageiro secundário, o GMPc, induzido pelo NO ou por peptídeos natriuréticos, também medeia funções na retomada da meiose de oócitos de mamíferos (TORNEILL et al, 1990; NAKAMURA et al, 2002; BU et al, 2004; ZHANG et al, 2005). O efeito do GMPc nas células pode ser mediado pela regulação da atividade de algumas fosfodiesterases (PDE2, PDE3 e PDE5) ou estimulação das PKGs. Altas concentrações de GMPc também podem afetar de forma indireta a atividade das PKAs (SRIRAMAN et al. 2006). A ação de fosfodiesterases específicas que hidrolisam o GMPc e a ação de inibidores que controlam a comunicação das *gap junctions* geram a estabilização do nível de GMPc nas células somáticas, o que é essencial para manutenção do bloqueio meiótico. A

influência do LH sobre o fechamento das *gaps junctions* causa a retomada da meiose revertendo esse bloqueio (NORRIS et al. 2009).

Os níveis de GMPc são balanceados entre a síntese pela guanilato ciclase (GC) e degradação por PDE-GMPc específicas (PDE5, PDE6 e PDE9), (KASS et al., 2007). Guanilato ciclase solúvel (GC), é uma proteína heterodimérica composta pelas subunidades α (grande) e β (pequena) (MURAD et al. 1986). Existem duas isoformas para cada subunidade, $\alpha 1$ (GUCY1A3), $\alpha 2$ (GUCY1A2), $\beta 1$ (GUCY1B3) e $\beta 2$ (GUCY1B2). As isoformas mais abundantes são $\alpha 1$ e $\beta 1$ que foram clonadas e seqüenciadas em bovinos, camundongos, ratos e humanos (LIU, et al,1996). Essas duas subunidades são igualmente distribuídas em tecidos de mamíferos, tendo seus RNAm expressos em altos níveis no cérebro, pulmão, coração, rim, baço e músculos (MONCADA, et al. 1991). A expressão das subunidades da GC são reguladas por estrogênios (KRUMENACKER et al. 2001), compostos que elevam AMPc (PAPAPETRPOULOS et al.1995) e doadores de NO (PAPAPETRPOULOS,et.al.,1996). A função da GC é afetada não somente pelo NO, mas igualmente pela regulação da expressão de subunidades do GC em nível transcricional e pós-transcricional. A localização sub-celular da GC e sua atividade podem igualmente ser afetadas pelas interações da proteína e por fosforilações (PYRIOCHOU, et al.2005).

2.2.2. AS FOSFODIESTERASES

As fosfodiesterases (PDEs) são enzimas intracelulares que catalizam especificamente a hidrólise dos segundos mensageiros cíclicos AMPc e GMPc. Existem 23 genes de PDE, divididos em 11 famílias de acordo com suas homologias, substratos específicos e atividades reguladoras (CONTE, et. al., 2000). Há PDEs que estão relacionadas à degradação do GMPc (PDE 5, 6 e 9) e outras à do AMPc (PDE 3, 4, 7, 8 e 10) ou de ambos (PDE 1, 2 e 11). Algumas PDEs que tem sua atividade sobre a degradação do AMPc e são controladas pelos níveis de GMPc (KASS et al. 2007), resultando num *cross-talk* entre as vias do GMPc e do AMPc (figura II.1). A regulação diferencial de cada isoforma de PDE em diferentes compartimentos do complexo *cumulus*-oócito estão envolvidas no controle dos níveis de AMPc e, conseqüentemente, na maturação (LIANG et al, 2005).

A PDE5 catalisa exclusivamente a degradação do GMPc, contrabalançando a produção deste pela GC. Assim a inibição da PDE5 aumenta os níveis intracelulares do GMPc e inicia uma cascata de reações, como o estímulo da atividade da PDE2 ou a inibição da atividade da PDE3. Em alguns sistemas, essa atividade também pode ser inibida pelo NO e análogos de GMPc resultando num aumento do AMPc (BRYAN, et al. 2009).

Wang et al.(2009) defendem a hipótese de que a PDE5 modula a maturação espontânea pela via GMPc/AMPC e não por sinais emitidos pela via GMPc/PKG. De acordo com esses autores, a inibição da PDE5, responsável pela degradação do GMPc, resulta em um aumento do nível desse nucleotídeo. O GMPc irá passar das células somáticas ao oócitos, pelas *gap junctions* e inibir a atividade da PDE3A, prejudicando a hidrólise do AMPc, que resulta na inibição na retomada da meiose.

A isoforma PDE3A é a que prevalece em oócitos e sua atividade favorece a retomada da meiose, exercendo a função de hidrólise do AMPc, tanto na maturação espontânea como na induzida por gonadotrofinas (RICHARD, et al. 2001). Já a PDE4 é o tipo que prevalece nos compartimentos somáticos e cada variante, exerce funções específicas e distintas (CONTI et al. 2002). A atividade da PDE3A foi aumentada depois do estímulo dado pelo LH, antes do RVG (MASCIARELLI et al. 2004) e a da PDE5 também após a estimulação pela LH (QING YUAN SUN, 2009). A deficiência das PDE3, PDE4 e PDE5 causam infertilidade, devido à incapacidade de retomar a meiose, demonstrando sua importância fisiológica no ovário de ratas (TSAFRIRI, et. al., 1996) e de suínos (LAFOREST et al.2005).

Figura II.1 Regulação dos níveis de GMPc e AMPc e o entrelaçamento das vias. Estão mostradas apenas as fosfodiesterases (PDE) que já foram identificadas em oócitos e/ou células da granulosa. A guanilato ciclase (GC) promove a síntese de GMPc e a adenilato ciclase (AC) promove a síntese de AMPc. As PDE5 e PDE6 são responsáveis pela degradação do GMPc enquanto as PDE3 e PDE4 degradam o AMPc. O GMPc, por sua vez, é capaz de inibir a PDE3, resultando no aumento dos níveis de AMPc.

Em bovinos e em humanos, tanto a inibição de PDE3A como a ativação da adenilase ciclase (AC), são processos parcialmente efetivos para manter o bloqueio meiótico. Os mecanismos de modulação do AMPc em oócitos bovinos parecem ser mais similares aos de

humanos do que aos de roedores (SHU, et al. 2008), apresentando diferenças entre espécies.

Quando se utilizou o bovino como modelo experimental, a PDE3 continua tendo atividade predominante em oócitos, mas 20% da atividade total das PDEs foi atribuída à PDE8A, sendo essa, a PDE predominante nas células do *cumulus* juntamente com baixos níveis de PDE4D. A inibição da PDE8A aumenta o nível de AMPc em complexos *cumulus* oócitos (COCs) atrasando a maturação nuclear nessa espécie. Nas células da granulosa, essas duas isoformas de PDE também foram encontradas, porém a mais freqüente é a PDE4 apresentando mudanças durante o crescimento folicular (SASSEVILLE, et al. 2009).

Oócitos bovinos, de forma similar a todos os outros mamíferos, retomam espontaneamente a meiose após serem retirados do ambiente folicular (PINCUS, et al. 1935). Essa maturação nuclear prematura compromete a capacidade de desenvolvimento do oócito comparado com o modelo *in vivo* (GREVE et al. 1987 e LONERGAN et al. 2003). Tentativas de retardar a maturação nuclear através da modulação de PDE específicas podem atrasar a ruptura das *gaps junctions* entre as células do *cumulus*, para dessa forma não interromper o fluxo de substratos ao oócito e melhorar a taxa e qualidade do desenvolvimento de blastocistos (THOMAS et al. 2004).

Pendey et al (2010) defendem que a redução do NO intra-oócito induz a retomada da meiose em mamíferos, agindo através da via GMPc/PDE3A/AMPc/PKA/CDC25B/MPF, dessa forma a redução de NO, diminuiria os níveis de GMPc, o que favoreceria a degradação do AMPc pela PDE3A, reduzindo o nível desse nucleotídeo e conseqüentemente diminuindo o efeito da PKA, a qual inativada irá estimular a fosfatase CDC25B, a desfosforilar a CDK1, ativando o MPF, favorecendo a retomada da meiose. Esse caminho é contraditório a outros autores que defendem diferenças desse evento, dentro da própria classe de mamíferos, intra-espécies.

2.3 ÓXIDO NÍTRICO

O NO é um radical livre altamente reativo com uma meia vida curta. Ele é rapidamente oxidado pra nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), dois produtos estáveis do metabolismo do NO (NORMA e CAMERON, 1996). Em mamíferos, o NO é sintetizado pela óxido nítrico sintase (NOS), uma enzima que converte a L-arginina em L-citrulina e NO na presença de oxigênio e vários cofatores como Ca_2^+ / calmodulina (RETTORI e McCANN, 1998). A NOS ocorre em três isoformas funcionais, a NOS neural (nNOS ou NOS1), a NOS induzível (iNOS ou NOS2) e a NOS endotelial (eNOS ou NOS3) (SESSA, 1994), sendo distinguidas por sua sensibilidade ao cálcio e à duração de produção de NO: a NOS1 e a NOS3 são Ca_2^+ /calmodulina dependentes, ou seja, o fluxo de cálcio irá regular sua

atividade, promovendo um curto período de produção de NO; a NOS2 é Ca_2^+ /calmodulina independente e por possuir a calmodulina como subunidade é permanentemente ativada e capaz de gerar NO por períodos prolongados (THOMAS et al. 2008).

Resultados contraditórios foram observados na participação do NO na respostas patofisiológicas (IGNARRO, 1998). Enquanto parte dos estudos mostrava que o NO era tóxico, outros mostravam que ele protegia as células (GRISHAM et al. 1999). A ação tóxica do NO foi atribuída à formação de espécies reativas de nitrogênio (ERN) que mediavam à morte celular, enquanto o efeito protetor foi proposto ocorrer por um mecanismo antioxidante (WINK et al. 1998). Assim, o NO pode causar um efeito conhecido como *Hormese*, em que quando uma molécula se encontra em baixa concentração, gera uma resposta biológica oposta àquela gerada por altas concentrações da mesma, podendo funcionar como um mecanismo de reparo no organismo. Esse efeito do NO pode se dar via GMPc, aumentando a atividade da PKG ou pela via de ação sobre proteínas reguladoras da apoptose (ANDOH et al, 2003). A química biológica do NO divide suas reações em duas categorias: direta e indireta. Os efeitos diretos são as reações que ocorrem rápido o suficiente para que o NO reaja diretamente com a molécula alvo. Em contrapartida, os efeitos indiretos requerem que o NO reaja com o oxigênio ou superóxido para gerar ERN, os quais subsequentemente reagiriam com as moléculas-alvo. Os efeitos diretos geralmente ocorrem quando o NO se encontra em baixa concentração, enquanto que os efeitos indiretos ocorrem em alta concentração (WINK et al.1996).

2.3.1 ÓXIDO NÍTRICO NA REPRODUÇÃO

O ovário é um órgão endócrino complexo que sofre mudanças estruturais e funcionais durante o ciclo estral. O mecanismo de controle dessas mudanças pode envolver muitos fatores que são produzidos dentro e fora do ovário. Um desses fatores reguladores é o NO, o qual é um mediador da ação de hormônios e neurotransmissores, de fundamental importância na regulação de vários processos fisiológicos envolvidos na reprodução (RETTORI; McCANN,1998).

Na esfera reprodutiva, o sistema NOS/NO foi identificado em vários tecidos. Observou-se, por exemplo, que o fluido folicular contém NO (BASINI et al, 1998) e que oócitos são capazes de produzir NO (HATTORI et al, 2000, 2004). Em ratas, a NOS3 foi detectada no ovário, tuba, útero, cérviz e vagina e sua expressão varia com as fases do ciclo estral (CHATTERJEE et al, 1996). Embriões de camundongo também expressam NOS (NISHIKIMI et al, 2001). Em camundongos, o NO parece ter papel na regulação do desenvolvimento de embriões, pré-implantação e na apoptose (CHEN et al, 2001, TRANGUCH et al, 2003).

O sistema NOS/NO tem sido relacionado às mais variadas funções reprodutivas como desenvolvimento folicular (camundongos, MITCHELL et al, 2004), esteroidogênese, expressão de receptores de LH (suínos, NISHIDA et al, 2000) e EGF (suínos, HATTORI et al, 1996) nas células da granulosa, maturação de oócitos (camundongas, JABLONKA-SHARIFF; OLSON, 1998; JABLONKA-SHARIFF; OLSON, 2000; ratas, JABLONKA-SHARIFF et al, 1999), ovulação, formação do corpo lúteo, fecundação, capacitação espermática, reação acrossômica, ligação do espermatozóide à zona pelúcida, desenvolvimento embrionário e implantação (camundongos, SENGOKU et al, 2001; TRANGUCH et al, 2003).

2.3.2 ÓXIDO NÍTRICO NA MATURAÇÃO OOCITÁRIA

A atividade da NOS tem sido relacionada à maturação de camundongos (SENGOKU et al, 2001), ratos (NAKAMURA et al, 2002), suínos (CHMELIKOVÁ et al, 2004) e à ativação do oócito de ouriço-do-mar (KUO et al, 2000) e de suínos (SEDMIKOVÁ et al, 2004).

De acordo com Bu et al (2003a, 2003b), o efeito do NO na maturação de oócitos de camundongos pode ser estimulatório ou inibitório dependendo de sua concentração. Quando os oócitos são cultivados na presença de hipoxantina (mantém os oócitos bloqueados em vesícula germinativa simulando o ambiente folicular) associada a uma baixa concentração de doador de NO (SNP), a meiose é estimulada. Por outro lado, quando o cultivo dos oócitos é realizado na presença de altas concentrações do doador de NO ou administração de inibidores de NOS (L-NAME), há um bloqueio da maturação meiótica em camundongos (JABLONKA-SHARIFF et al. 2000) e em bovinos (SCHWARZ et al. 2010). Em suínos, o inverso parece ser verdadeiro. Chmeliková et al (2010), demonstraram que alto nível de NO, induz a retomada da meiose a partir da fase diplóteno da prófase I.

Em bovinos, há poucos dados a respeito do papel do sistema NOS/NO nos diversos aspectos da atividade reprodutiva dessa espécie. Sabe-se que as células da granulosa de folículos iniciais produzem mais NO do que os folículos em estádios mais avançados (BASINI et al.1998), mostrando assim que a atividade da NOS muda durante o desenvolvimento folicular. Foi observado que oócitos bovinos apresentam a proteína eNOS (NATORI et al. 2005) e que a mesma é ativa (REYES et al, 2004). Análises quantitativas de expressão gênica (RNAm) revelaram uma complexa interação entre as três isoformas de NOS nos oócitos e embriões bovinos durante o desenvolvimento inicial (TESFAYE et al. 2006).

Foi relatado em bovinos que o NO pode ter efeitos deletérios na maturação do oócito e no desenvolvimento embrionário e que esse mensageiro poderia estar envolvido na queda

de fertilidade ocasionada por doenças infecciosas e processos inflamatórios como a mastite (SOTO et al. 2003).

Também nessa espécie, o NO apresenta efeito dúbio na maturação *in vitro*, dependendo de sua concentração e sistema de cultivo. Baixo nível de NO gerado por uma pequena concentração do SNP (doador de NO - 0,01 μ M) induz a retomada da maturação meiótica de oócitos bovinos cultivados *in vitro* e altas concentrações (100 e 500 μ M) inibem a retomada da meiose (BILODEAU-GOESEELS et al. 2007). Oócitos de bovinos sintetizam NO durante a MIV e a inibição da síntese, durante este período, acarreta uma diminuição na produção *in vitro* de blastocistos (MATTA et al.2002) e aumenta o número de núcleos apoptóticos nos blastocistos produzidos, sugerindo que o NO na MIV possa exercer um efeito anti-apoptótico tardio (SCHWARZ et al. 2010). O efeito de citotoxicidade, devido à alta concentração de NO, gerada por 10⁻³M de outro doador de NO (SNAP), prejudicou a progressão para MII e inibiu o desenvolvimento embrionário (SCHWARZ et al. 2008). As evidências sugerem, portanto, que o sistema NOS/NO deve ter um papel importante na biologia do oócito também na espécie bovina.

Um mecanismo pelo qual o NO pode participar da maturação oocitária envolve a regulação da síntese de nucleotídeos cíclicos (NATHAN, 1992). A interação entre o NO e seu receptor primário, guanilato ciclase solúvel (GC), estimula a produção de GMP cíclico em células-alvo ativando uma cascata de eventos intracelulares. O NO aumenta o nível de GMPc mantendo o bloqueio meiótico e sua redução gera uma diminuição do GMPc, induzindo a retomada da meiose (ZHANG et al. 2009).

2.3.3. VIA DE SINALIZAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO

Uma das principais vias de sinalização do NO é a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GC), resultando na produção de GMPc, cuja via de ação mais comum envolve a ativação da proteína cinase dependente de GMPc (PKG) e atividade sobre algumas das enzimas da família das fosfodiesterases (PDE; DENNINGER e MARLETTA, 1999; figura II.2).

Figura II.2 Via de sinalização da NOS pelo GMPc. NOS, enzima óxido nítrico sintase responsável pela síntese de óxido nítrico (NO); GC, enzima guanilato ciclase ativada por NO e responsável pela síntese de GMPc; GMPc, nucleotídeo cíclico capaz de ativar canais iônicos, proteína cinase dependente de GMPc (PKG) e fosfodiesterases (PDEs) GMPc específicas.

Alguns estudos indicam que o NO, ao ativar a GC, aumenta o nível de GMPc mantendo o bloqueio meiótico no estágio diplóteno da prófase I e o fato contrário, a diminuição do nível de NO, reduz o nível de GMPc induzindo a retomada meiótica (ZHANG et al. 2009). A necessidade da queda do nível de GMPc para que seja possível ocorrer a maturação, já havia sido relatada por Törnell et al. (1990), que ao aplicar microinjeções desse nucleotídeo em oócitos imaturos de ratas, obtiveram um atraso na retomada da meiose.

O caminho mais comum da ação do GMPc é mediado pela ativação da família PKG (PKGI e PKGII), as quais fosforilam substratos específicos da célula, influenciando em suas atividades e conduzindo uma série de efeitos (VACCARI et al. 2008). A PKGI, medeia a regulação da expressão gênica e nível de proteínas (FRANCIS et al. 2010) e a PKGII fosforila substratos relacionados a processos ovulatórios (SRIRAMAN et al. 2006).

CAPÍTULO III

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Efeito do aumento de NO e da manipulação da atividade de componentes da via GC/GMPc sobre a maturação nuclear.

Figura III.1 Grupos de 23 oócitos por tratamento foram distribuídos em microgotas de meio de cultivo indefinido (fase I: com a presença de SFB e hormônios), semi-definido (fase II e fase III: sem SFB e hormônios), acrescidos ou não das respectivas drogas e avaliados no início (RVG: 7 ou 9 h de MIV) e no final (MII: 24 horas de MIV). O grupo controle foi cultivado sem as drogas e todos os ensaios de dose-resposta foram realizados em 4 repetições.

3.2 Mensuração de GMPc e AMPc em oócitos bovinos maturados *in vitro*.

Figura III.2: Os níveis de GMPc e AMPc foram mensurados em grupos de oócitos imaturos (0 hora) e maturados na presença do doador de NO isolado (10⁻⁷M de SNAP) ou associado com o inibidor de GC (+ 10⁻⁷M de SNAP + 100μM de OQD), durante 1, 3 e 6 horas de maturação. Para cada um dos três momentos de coleta foi cultivado um grupo controle que permaneceu apenas em meio B199, sem a suplementação de hormônios ou soro e sem o acréscimo das drogas. Foram utilizados pools de 30 oócitos pra cada tratamento avaliado por imunoensaio para mensuração do GMPc e 10 oócitos para o de AMPc. Foram realizadas 4 repetições por nucleotídeo e por cada tempo de cultivo de maturação.

3.3 Efeito do SNAP (doador de NO) associado ou não ao OQD (inibidor da GC) na abundância relativa de transcritos dos componentes da via do GMPc (NOS2, NOS3, GUCY1B3, PKG2 e PDE5A) e AMPc (ADCY6, PKA1, PDE3A, PDE4D e PDE8A) em oócitos e células do *cumulus*.

Figura III.3: Pools de 22 CCOs foram maturados por 24 horas para cada tratamento. Após esse período, foi feita a separação das células do *cumulus* e oócito, possibilitando a avaliação dos transcritos por compartimento celular. Para cada gene alvo analisado foram avaliados simultaneamente os controles endógenos (ACTB e PPIA) de cada amostra em cada tratamento, por 4 repetições e em duplicatas. As duplicatas foram feitas em placas separadas a fim de se apurar a precisão dos resultados e levou-se em consideração a temperatura de anelamento de cada gene. A proporção dos genes transcritos foi avaliada em relação aos grupos imaturos (0 hora de desenvolvimento). Os genes circulados em vermelho, correspondem à via GMPc e os genes circulados em verde, correspondem à via AMPc.

CAPÍTULO IV

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do experimento

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Histologia do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP) – Campus de Pirassununga - SP.

4.2. Obtenção de complexos cumulus-oócitos

Os complexos cumulus-oócitos (CCO) foram obtidos de ovários de vacas zebus ou azebuadas oriundos de frigoríficos, localizados nos municípios de Sertãozinho, Ipuã, Lençóis Paulista e Barretos no Estado de São Paulo. Os ovários foram coletados logo após o abate e transportados em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9% – Sigma, S9625) acrescida de antibióticos (100 UI/ml de penicilina – Sigma, P7794 e 100 µg/ml de estreptomicina – Sigma, S9137) a uma temperatura de 30°C. No laboratório, os ovários foram lavados com a solução semelhante ao do transporte. Os folículos de 2 a 8 mm de diâmetro foram aspirados com auxílio de uma agulha de 18 “G” (1,20 X 40 mm) acoplada a uma seringa descartável de 10 ml. O líquido folicular aspirado foi depositado em tubos cônicos de 50 ml e mantido em repouso para decantação por 5 minutos. A porção superior do líquido foi retirada e na porção restante foram adicionados 3 a 5 ml de meio H199 [TCM199 com 25 mM de Hepes (Sigma, M2520 acrescido de 100 UI/ml de gentamicina e 1% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, 26140-079)].

Posteriormente, o material do tubo foi transferido para uma placa de *Petri* (60 x 15 mm – Falcon, 353002) onde foi feita a busca dos CCO sob estereomicroscópio para avaliação e classificação dos mesmos. Somente CCO classificados como graus I e II (DE LOOS *et al*, 1991), com três ou mais camadas de células do *cumulus oophorus* e citoplasma uniforme, foram utilizados para os experimentos.

4.3 Maturação *in vitro*

Para maturação *in vitro* (MIV), os CCO selecionados foram cultivados em dois meios de maturação diferentes, de acordo com a fase do experimento:

- Fase 1: meio de maturação indefinido constituído de B199 [TCM199 (Sigma, M5017) 26 mM de NaHCO₃ (Sigma, S5761) suplementado com 10% SFB; 5,0 µg/ml de hormônio luteinizante (LH, Bioniche – Lutropin-V); 0,5 µg/ml de hormônio folículo estimulante (FSH, Bioniche – Folltropin-V); 0,2 mM de

piruvato de sódio (Sigma, P5280) e 10 µg/ml de gentamicina (Sigma, G1272).

- Fases 2 e 3: meio de maturação semi-definido, constituído B199 suplementado com 0,4% de BSA [albumina sérica bovina (Sigma, A9647); 0,2 mM de piruvato de sódio e 10 µg/ml de gentamicina].

Os CCO foram maturados em meio MIV acrescido de diferentes concentrações de estimuladores ou inibidores da via GC/GMPc, (conforme descrito no delineamento experimental) em microgotas de 100 µL de meio (20-25 CCO por gota) sob óleo mineral (Sigma, M8410) em incubadora a 38,5°C, atmosfera de 5% CO₂ em ar e máxima umidade por até 24 horas.

4.3.1 Solução estoque do SNAP

O doador de óxido nítrico, SNAP (S-nitroso-N- acetylpenicillamine – Calbiochem, 48910) foi preparado em solução estoque de 10⁻³M em dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma, D5879), aliquotado em tubos para microcentrifuga e conservado no freezer a -20° C. As diferentes concentrações que foram usadas (10⁻⁷, 10⁻⁸ e 10⁻⁹M) foram rediluídas em B199 no dia do experimento.

4.3.2 Solução estoque do OQD

O inibidor da gualinato ciclase, OQD (1H- [1,2,4] oxadiazolo [4,3a] quinoxaline-1-one; Biomol, P8020) foi preparado em solução estoque de 10M em DMSO e rediluído para 1M com B199, aliquotado em tubos para microcentrifuga e conservado no freezer a -20° C. No dia do experimento eram preparadas as concentrações de cultivo de OQD (0, 1, 10, 100, 150, 200, 500 e 1000 µM) em B199.

4.3.3 Solução de Protoporfirina IX

A estimuladora da guanilato ciclase, Protoporfirina IX (Biomol, CN 230), era preparada no dia do experimento a 1000µM em DMSO e rediluída em B199 nas diferentes concentrações utilizadas no cultivo dos oócitos (0, 5, 10 e 50 µM).

4.3.4 Solução estoque do 8-Br-GMPc

O análogo do GMPc, 8-Br-GMPc (8-Bromoguanosine-3',5'cyclic-monophosphate; *Biomol, CN-205*), foi preparado em solução estoque de 10.000 μ M em B199, aliquotado em tubos para microcentrífuga e conservado no freezer a -20°C. No dia do experimento eram preparadas as concentrações utilizadas no cultivo (0, 1, 2 e 4 mM de 8-Br-GMPc) em B199.

4.3.5 Solução estoque de KT5823

O inibidor das proteínas cinases dependentes de GMPc (PKG), denominado KT 5823 (*Biomol, EI-200*) foi preparado em solução estoque de 10M em DMSO e rediluído para 1M com B199, aliquotado em tubos para microcentrífuga e conservado no freezer a -20°C. Para o experimento, o KT5823 era preparado nas concentrações utilizadas na maturação dos oócitos (0, 0.1, 1, 10, 20, 50 e 100 μ M) em B199.

4.4. Determinação do estágio da meiose dos oócitos

Para determinação do estágio da meiose, os oócitos dos CCO foram desnudados (remoção das células do *cumulus oophorus*) em tubo de 5 mL com 0,2 mL de PBS acrescido de 0,01% PVA (álcool polivinílico – Sigma, P8136) e agitados no “vortex” por 3 minutos (figura III.1). Os oócitos desnudos foram fixados entre lâmina e lamínula por 24 horas em etanol (Synth, A1084.01.BJ) e ácido acético (Synth, A1019.01.BJ) 3:1. Após a fixação, foram corados com lacmóide 1% (Aldrich, 274720) e observados em microscópio de contraste de fase (Zeiss, Germany) para determinação da porcentagem de rompimento da vesícula germinativa e de maturação dos oócitos.

Figura IV.1: Procedimento para fixação e coloração de oócitos (Adona *et al.*, 2006).

Os oócitos foram classificados de acordo com a configuração nuclear em vesícula germinativa (VG), rompimento da vesícula germinativa (RVG), metáfase I (MI) (Figura IV.2), anáfase I (AI), telófase I (T I) e metáfase II (MII) com a extrusão do primeiro corpúsculo polar (Figura IV.3). A taxa de RVG foi determinada como sendo a proporção de oócitos em RVG e MI, ou seja, que retomaram a meiose, em relação ao número total de oócitos colocados em cultivo.

Figura IV.2: Oócitos em estágio de vesícula germinativa (A) e metáfase I (B). O RVG (rompimento da vesícula germinativa) é considerado a partir do momento em que não é mais possível visualizar a membrana nuclear indicada pela seta.

A taxa de maturação foi considerada como sendo a proporção de oócitos que continuaram a progressão da meiose para a metáfase II (pós-MI), que é finalizada com a extrusão do primeiro corpúsculo polar, em relação ao número total de oócitos colocados em cultivo. Oócitos em AI, TI e MII foram agrupados nessa categoria.

Figura IV.3. Oócitos em estágio de metáfase I/ anáfase I (A), anáfase I/telófase I (B); C) metáfase II (C). A seta vermelha indica a placa metafásica e a seta azul o 1º corpúsculo polar.

4.5 Mensuração dos níveis intracelulares dos nucleotídeos GMPc e AMPc

Os nucleotídeos AMPc e GMPc foram mensurados pelo método de imunoensaio enzimático (EIA). Para tanto, foram preparados *pools* de CCO (10 e 30 CCO para a mensuração de AMPc e GMPc, respectivamente) tomando-se o cuidado para que o tamanho do revestimento de células do *cumulus* em torno dos oócitos fossem similares. As mensurações do GMPc e AMPc foram feitas em 2 experimentos independentes. Grupos de CCO coletados com 0h (imaturo) 1, 3 e 6 horas de maturação *in vitro* foram lavados rapidamente em TCM-199 com 20mM de Hepes (Sigma, M2520) e 0,4%BSA (Sigma, A9647) e transferidos para 200µl de 0,1N HCL por 20 minutos para lise das células e eventualmente foram “vortexados” para se obter uma lise mais eficiente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e armazenados a -20°C até serem submetidos aos imunoensaios de acordo com as instruções dos respectivos kits (Direct Cyclic AMP e GMP EIA, Enzo® Life Sciences, Ann Arbor, MI, EUA). Os reagentes utilizados foram os adquiridos nos kits, exceto quando mencionados. De acordo com os protocolos do fabricante dos kits, as amostras foram incubadas com o anticorpo primário IgG (localizado nos poços das placas), juntamente com uma solução contendo fosfatase alcalina e uma terceira solução contendo o anticorpo secundário policlonal de coelho específico para AMPc ou GMPc.

Após duas horas de incubação, os poços foram lavados com PBS e tratados com duas soluções: a primeira de *p-nitrophenyl phosphate* (pNpp) por 1 hora em temperatura ambiente, protegido de luz, que tem como função de reagir com o substrato que se encontra nos poços e provocar uma alteração na coloração (amarelada) e a segunda após esse período, a *stop solution*, que tem a função de interromper esta reação.

A mensuração das amostras foi realizada em duplicatas e da média destas duplicatas foi subtraído o valor do branco. O valor de absorbância dado pela leitura do espectrofotômetro com filtro de excitação de luz de 405nm foi utilizado em duas funções logarítmicas geradas pelas curvas-padrão construídas com concentrações conhecidas de AMPc e GMPc.

4.6 Congelamento e armazenamento dos oócitos e células do cumulus para análise dos transcritos por PCR (reação em cadeia de polimerase)

Inicialmente, os CCO foram transferidos para gotas de 150µl de PBS livre de cálcio e magnésio com 0,01% de PVA (PBS/PVA) e pipetados por diversas vezes para isolamento das células do *cumulus* sem lisá-las. Após a recuperação desses oócitos parcialmente desnudos, o volume de 150µl de PBS contendo as células do *cumulus* que foram removidas dos oócitos foi centrifugado a 1200 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi acrescentado 1U/µl de RNase Out (Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen™, 40U/µL Carlsbad, CA, EUA) e o tubo foi rapidamente mergulhado em nitrogênio líquido e armazenado a -80° C. Os oócitos parcialmente desnudos foram colocados em tubos de 5ml com 200µl de PBS/PVA, agitados em “vortex” por 4 minutos, novamente recuperados e lavados 3 vezes em PBS/PVA para garantir que as células do *cumulus* restantes não fossem congeladas junto com os oócitos. A quarta lavagem foi realizada em uma gota com 1U/µl do inibidor de RNase. Por fim, grupos de 22 oócitos foram transferidos para microtubos, mergulhados em nitrogênio líquido e armazenados a -80° C.

4.7 Desenho dos primers

Os *primers* foram desenhados usando o programa Primer 3 Plus (ROZEN et al. 2000) e otimizados através do *Autodimer* (<http://yellow.nist.gov:8444/dnaAnalysis/primerToolsPage.do>) e estão descritos na tabela IV.1.

Tabela IV.1 Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados para quantificação relativa dos genes selecionados.

Genes Alvos	Sequência (5' - 3')	GenBank	Tamanho do Fragmento (PB)
ADCY6 <i>adenylate cyclase 6</i>	5' GACTTGTGCCGTGTA CTCTG 3' 5' CCAACTGCCGTGCTATGTG 3'	NM_001143877. 1	99
GUCY1B3 <i>guanylate cyclase 1, soluble, beta 3</i>	5' CTCCCTGGTCCGTCCTCAT 3' 5' ATCCAACAACCCCTTCCTTGC 3'	NC_007315	88
NOS2 <i>nitric oxide synthase 2, inducible</i>	5' AGGTGCACACCGCCTATT 3' 5' CCGCAGGATGTCTTGAACA 3'	NM_001076799. 1	113
NOS3 <i>nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)</i>	5' CCTTTGGTGTTTAGGTGAATTTTAG 3' 5' TGGCTTAGGCATCTTAGTAGGTCTC 3'	NC_007302.4	159
PDE3A <i>phosphodiesterase 3A, cGMP-inhibited</i>	5' ATCACCCGGAAGGACTAAT 3' 5' CGCATGATGATTCTCCAAGA 3'	XM_616776. 4	95
PDE4D <i>phosphodiesterase 4D, cAMP-specific</i>	5' ACCCTACAGACCAGGCACTC 3' 5' TTCCAGACCGACTCATTTTCAG 3'	BOS_19744	100
PDE5A <i>phosphodiesterase 5A, cGMP-specific</i>	5' TGATCAGTGCCTGATGATCC 3' 5' AATGGAGAGGCCACTGAGAA 3'	NM_174417. 2	61
PDE8A <i>phosphodiesterase 8A</i>	5' CTCCCTGGTCCGTCCTCAT 3' 5' ATCCAACAACCCCTTCCTTGC 3'	NC_007319-4	88
PKA1 <i>protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha</i>	5' CTGCTCAAGGACTCCATCGT 3' 5' AGGTTCTGGATCTGCTTTGC 3'	NM_001076358. 1	116
PKG2 <i>cGMP-dependent protein kinase II</i>	5' AAGCAGCAGGAGCATGTCTA 3' 5' TTGTCCTGAAGGTGCGATA 3'	XM_612707. 3	92
Genes Endógenos			
ACTB <i>actin, beta</i>	5'CGCAGAAAACGAGATGAGATTG 3' 5'TGTCACTTCACCGTTCCAGT3'	NC_007326.4	119

PPIA	5' CCACCGTGTCTTCGACATC 3'		
<i>peptidylprolyl isomerase A</i>	5' ATCCTTCTCTCCAGTGCTCAG 3'	NM_178320. 2	126

4.8 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído separadamente dos oócitos e células do *cumulus* com o RNeasy Protect Micro kit (Qiagen, Hilden, Germany), conforme o protocolo do fabricante. A quantificação do RNA total foi realizada no NanoDrop 2000 (Spectrophotometer – Thermo Scientific), medindo-se a densidade óptica entre os comprimentos de ondas: DO260/ DO280_(nm). Foram consideradas as amostras que resultaram valores desta razão próximos a 2, identificando sua pureza. A qualidade das amostras de RNA, também foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo e exposto ao campo elétrico de 50 V (Figura IV.4).

Figura IV.4. Em 1, 2 e 3, exemplos de amostras de RNA preservadas e em 4 uma amostra de RNA degradada.

4.9 Transcrição reversa

O RNA foi incubado 5 minutos a 65°C com 1µL de Oligo (dt)¹²⁻¹⁸ (0,5µg/µL, Invitrogen™) e 1µL de dNTP MIX (10mM), em seguida resfriado a 4°C para a adição de 1µL da enzima de transcriptase reversa (200U/µL; Super Script III™ Reverse Transcriptase, Invitrogen™) e os demais reagentes: tampão 5x (4 µL), 1µL de inibidor de RNase (RNase OUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen™, 40U/µL) e 1µL de Dithiothreitol (DTT 0,1M, Invitrogen™) em um volume final de 9µL de solução para 11µL de RNA. A reação para produção do cDNA foi realizada em termociclador (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), onde as amostras foram incubadas a 50°C por 60 minutos, aquecidas a 70°C

por 15 minutos para inativação da enzima, resfriadas a 4°C e armazenadas a -20°C até o momento de uso.

4.10 Pré-amplificação

Alguns dos genes alvos estudados necessitaram de uma pré-amplificação do cDNA das amostras, para se obter uma melhor detecção. Os genes alvos de interesse foram: genes ligados ao nível de NO (NOS3), de GMPc (GUCY1B3) ou de AMPc (PDE4D, PDE8A e PDE8B). Como endógenos foram usados dois genes (ACTB e PPIA) para maior confiabilidade das análises.

Antes da amplificação por PCR quantitativo, os cDNAs foram pré-amplificados utilizando a Taq 2X Master Mix (MO270- Bio Labs). Inicialmente foi feito um mix contendo 450 nM de cada *primer* (NOS3, GUCY1B3, PDE4D, PDE8A, ACTB e PPIA) numa reação de 100µl e em seguida foi montada uma segunda reação contendo 10µl da Taq 2X Máster Mix, 2µl do mix de *primer* (preparado anteriormente), 4µl de cDNA das amostras e 4µl de água, submetida à desnaturação a 95°C por 30 segundos, seguida de 20 ciclos térmicos constituídos de 95°C por 15 segundos, 57°C durante 60 segundos e 68°C durante 1 minuto, finalizado por uma extensão final a 68°C por 5 minutos e armazenados a -20°C. A linearidade de amplificação de todos os transcritos considerados foi determinada como descrito anteriormente (CHIARATTI et al. 2011).

O PCR quantitativo para a quantificação relativa de RNAm de genes específicos foi feito em reações de 20µl, individuais para cada gene, contendo 2µl de primer para cada gene alvo ou endógeno (ACTB e PPIA, TATSUMI et al. 2008), na concentração de 2µM, mais 10 µl de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 6µl de água e 2µl de amostra. Para cada amostra de células do *cumulus*, os cDNA pré-amplificados foram diluídos 25X e para cada amostra de oócitos 125X.

4.11 PCR em tempo real

As amplificações foram realizadas em termociclador para PCR em tempo real (Applied Biosystems, 7500 Real Time PCR System). Nas reações para a quantificação relativa dos genes alvo descritos na tabela IV.1, foi utilizado o SYBR® PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador em reação de 20µL. A reação teve início com incubação a 50°C por 2 minutos, seguida de desnaturação a 95°C por 10 minutos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 57°C por 1 minuto. Cada amostra foi avaliada em duplicata para os genes alvo que não foram pré

amplificados, junto ao controle endógeno beta actina (ACTB) e em triplicata para os genes alvo pré amplificados, junto aos controles endógenos PPIA e ACTB.

4.11.1 Análise dos dados da PCR:

Para validação dos genes alvo pré amplificados, a abundância relativa de cada gene, para cada amostra, foi determinada em relação à média dos endógenos pelo método de curva padrão, padronizada por Livak et al (2001). E para validação dos genes não pré amplificados foram considerados os dados da curva padrão com oócitos maturados em 5 diluições seriadas 1:1. A partir da inclinação da curva ou “slope” pôde-se calcular a eficiência de amplificação ($E=10^{((-1/\text{“SLOPE”})-1)}$) para cada gene estudado (Figura IV.5).

Figura IV.5 Curva padrão de amplificação para o gene ACTB por PCR em tempo real para oócitos maturados em diluições 1:1.

Após estes cálculos, os genes-alvo foram comparados com o gene endógeno por diferença de Ct. Em seguida, estes dados foram plotados em um gráfico em que o “SLOPE” da comparação desta diferença entre o gene deveria ser menor que 0.1. Desta forma, os genes estudados poderiam ser considerados com a mesma eficiência (figura IV.6).

Para todos os genes foi estabelecida a mesma linha de “threshold” no ponto médio da amplificação exponencial. As razões de expressão foram normalizadas pela razão de expressão do controle endógeno (ACTB). As diferenças nas frequências dos transcritos dos genes foram calculadas pelo método comparativo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para isso, foi primeiramente calculada a média das duplicatas das amostras e a diferença entre a média dos Ct do gene-alvo e do gene endógeno (ΔCt). Após isso, fez-se a média dos ΔCt para o grupo controle (ΔCt médio) e a diferença entre ΔCt e ΔCt médio para cada amostra, finalizando-se com a seguinte fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Após este cálculo, houve a normalização dos dados com a média do controle imaturo de cada gene estudado.

Figura IV.6: Em A e B: Exemplo do cálculo de eficiência dos genes ACTB e NOS2 baseado no *slope*. C: Diferença de CT dos dois genes em estudo para a validação da comparação relativa entre ambos.

4.11 Análise estatística

Todos os experimentos, repetidos de 3 a 4 vezes, foram estatisticamente analisados pelo software Statistical Analysis System (SAS) com 5% de nível de significância. Como teste primário foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e quando necessário, os pós-testes de “Tukey” para os experimentos de taxas de maturação e quantificação relativa dos genes alvos e de “Bonferroni” para o experimento de determinação dos níveis de AMPc e GMPc, especificamente nesse experimento também foi analisado a relação entre tempo e tratamento pelo software Prism 5.

CAPÍTULO V

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Fase I – Efeito da manipulação dos níveis de NO e da atividade de componentes da via GC/GMPc sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos cultivados em meio indefinido.

A seguir, estão apresentados os resultados dos ensaios de dose-resposta a diferentes drogas que aumentam os níveis de NO e que inibem ou estimulam diferentes componentes da via GMPc sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos cultivados em meio de maturação indefinido (presença de SFB e hormônios).

5.1. Influência do NO sobre o rompimento da vesícula germinativa

Nesse experimento foram avaliadas diferentes concentrações de SNAP (0, 10^{-9} , 10^{-8} e 10^{-7} M) adicionadas ao meio de maturação visando determinar o efeito do aumento de NO sobre a capacidade dos oócitos de retomar a meiose, rompendo a vesícula germinativa após 7h de cultura *in vitro*. Pode-se observar que não houve efeito do SNAP em nenhuma das concentrações avaliadas, sendo a proporção de RVG (rompimento da vesícula germinativa) de aproximadamente 25 a 42% (Tabela V.1).

Tabela V.1: Proporção de oócitos bovinos maturados *in vitro* com diferentes concentrações do doador de óxido nítrico (SNAP) que romperam a vesícula germinativa (RVG) após 7h de maturação.

SNAP	Total de oócitos	Oócitos em RVG*
	n	n (% $\pm$ DP)
0 (controle)	118	43 (36,4 $\pm$ 9,2)
10^{-9} M	114	35 (30,7 $\pm$ 7,6)
10^{-8} M	122	51 (41,8 $\pm$ 6,0)
10^{-7} M	102	25 (24,5 $\pm$ 5,2)

* Inclui os oócitos que romperam a vesícula ou atingiram a metáfase I. Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$). Resultados correspondentes a cinco repetições realizadas.

5.2. Influência do NO sobre a maturação nuclear

Foram avaliadas diferentes concentrações do doador de NO (0, 10^{-9} , 10^{-8} e 10^{-7} M de SNAP) durante a MIV visando determinar o efeito do aumento de NO sobre a capacidade dos oócitos de concluir a maturação nuclear *in vitro*, alcançando a fase de desenvolvimento de metáfase II.

O doador de NO (SNAP), nas concentrações estudadas, não apresentou efeitos significativos na porcentagem de oócitos que progrediram na meiose após 24h de cultivo. A taxa média de maturação variou de 79,5 a 85,3% ($P > 0,05$, Tabela V.2).

Tabela V.2: Maturação nuclear de oócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro* por 24h na presença de diferentes concentrações de SNAP.

SNAP	Oócitos n	Estádios da meiose	
		Pré-MI ¹ n	Pós-MI ² n (% $\pm$ DP)
0 (controle)	100	15	85 (84,8 $\pm$ 7,1)
10^{-9} M	109	21	88 (80,6 $\pm$ 3,4)
10^{-8} M	111	22	89 (79,5 $\pm$ 5,7)
10^{-7} M	117	17	100 (85,3 $\pm$ 8,2)

¹ oócitos em metáfase I (Pré-MI); ² oócitos em anáfase I, telófase I e metáfase II (Pós-MI), considerados maturados. Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$). Resultados correspondentes a cinco repetições realizadas.

5.3. Influência do OQD (inibidor de guanilato ciclase) sobre a maturação nuclear.

Diferentes concentrações do inibidor da guanilato ciclase (0, 1, 10 e 100 μ M de OQD) foram avaliadas durante a MIV visando determinar o efeito da diminuição de síntese de GMPc durante o período de 24 horas de maturação *in vitro*. Os resultados estão apresentados na tabela V.3.

Tabela V.3: Maturação nuclear de oócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro* por 24h na presença de diferentes concentrações de OQD.

OQD	Oócitos n	Estádios da meiose	
		Pré-MI ¹ n	Pós-MI ² n (% ± DP)
0 (controle)	66	12	54 (82,4 ± 5,0)
1 µM	68	12	56 (82,3 ± 3,5)
10 µM	66	12	54 (82,2 ± 6,0)
100 µM	69	11	58 (84,2 ± 2,6)

¹ oócitos em metáfase I (Pré-MI); ²oócitos em anáfase I, telófase I e metáfase II (Pós-MI), considerados maturados. Não houve diferença significativa entre os tratamentos (P>0,05). Resultados correspondentes a três repetições realizadas.

A inibição da GC não interferiu na capacidade do oócito de maturar *in vitro*, alcançando uma taxa de maturação de 82,2 a 84,2% para todos os tratamentos (controle, 1µM, 10µM e 100µM).

5.4. Influência da Protoporfirina IX (estimuladora da guanilato ciclase) sobre a maturação nuclear.

Nesse experimento foram avaliadas diferentes concentrações do estimulador de guanilato ciclase (0, 5, 10 e 50µM de Protoporfirina IX) durante a MIV visando determinar o efeito do estímulo à GC durante o período de 24 horas de maturação *in vitro*.

Embora não se tenha avaliado o nível de GMPc em cada tratamento, o estímulo à sua síntese com diferentes concentrações de Protoporfirina IX, não exerceu influência sobre a retomada da meiose em oócitos bovinos quando utilizada no meio de cultivo indefinido, resultando numa taxa de maturação de 82,4% para o grupo controle e de 79,6; 88,8 e 91% para os demais tratamentos (5, 10 e 50µM, respectivamente), conforme descrito na Tabela V.4.

Tabela V.4: Maturação nuclear de oócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro* por 24h na presença de diferentes concentrações de Protoporfirina IX.

Protoporfirina IX	Estádios da meiose		
	Oócitos	Pré-MI ¹	Pós-MI ²
		n	n (% ± DP)
0 (controle)	66	12	54 (82,4 ± 5,0)
5 µM	64	13	51 (79,6 ± 5,6)
10 µM	65	7	58 (88,8 ± 6,4)
50 µM	67	6	61 (91,0 ± 7,8)

¹ oócitos em metáfase I (Pré-MI); ²oócitos em anáfase I, telófase I e metáfase II (Pós-MI), considerados maturados. Não houve diferença significativa entre os tratamentos (P>0,05). Resultados correspondentes a três repetições realizadas.

5.5. Influência do 8-Br-GMPc (análogo do GMPc) sobre a maturação nuclear.

Diferentes concentrações do análogo do GMPc (0, 1, 2 e 4mM de 8-Br-GMPc) foram analisadas durante a MIV visando determinar o efeito do aumento do nível de GMPc durante o período de 24 horas de maturação *in vitro*. Nesse estudo, a taxa de maturação não foi afetada pelo 8-Br-GMPc, variando aproximadamente entre 86 a 88%% (P>0,05) após 24h de cultivo em meio indefinido (Tabela V.5).

Tabela V.5: Maturação nuclear de oócitos submetidos à maturação *in vitro* por 24h na presença de diferentes concentrações de 8-Br-GMPc.

8-Br-GMPc	Estádios da meiose		
	Oócitos	Pré-MI ¹	Pós-MI ²
		n	n (% ± DP)
0 (controle)	66	9	57 (86,3 ± 0,6)
1 mM	68	9	59 (86,9 ± 3,5)
2 mM	66	8	54 (88,1 ± 3,2)
4 mM	70	10	60 (86,0 ± 4,6)

¹ oócitos em metáfase I (Pré-MI); ²oócitos em anáfase I, telófase I e metáfase II (Pós-MI), considerados maturados. Não houve diferença significativa entre os tratamentos (P>0,05). Resultados correspondentes a três repetições realizadas.

5.6. Influência do KT5823 (inibidor de PKG) sobre a maturação nuclear.

Nesse experimento foram avaliadas diferentes concentrações do inibidor da proteína cinase dependente de GMPc (0, 0,1 μ M, 1 μ M e 10 μ M de KT5823) durante a MIV visando determinar o efeito da inibição de PKG durante o período de 24 horas de maturação *in vitro*. Observou-se que o tratamento com KT5823 resultou em uma taxa de maturação que variou de 85,5% a 90%, sem diferenças significativas entre os tratamentos ($P>0,05$; Tabela V.6).

Tabela V.6: Maturação nuclear de oócitos submetidos à maturação *in vitro* por 24h na presença de diferentes concentrações de KT5823.

KT 5823	Oócitos n	Estádios da meiose	
		Pré-MI ¹ n	Pós-MI ² n (% $\pm$ DP)
0 (controle)	67	8	59 (88,1 $\pm$ 2,3)
0,1 μ M	65	7	58 (89,2 $\pm$ 6,7)
1 μ M	69	10	59 (85,5 $\pm$ 7,6)
10 μ M	68	7	61 (90,0 $\pm$ 6,1)

¹ oócitos em metáfase I (Pré-MI); ²oócitos em anáfase I, telófase I e metáfase II (Pós-MI), considerados maturados. Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P>0,05$). Resultados correspondentes a três repetições realizadas.

Fase 2 – Efeito da manipulação da atividade de componentes da via GC/GMPc sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos cultivados em meio semi-definido.

Como nos experimentos anteriores não foram observados efeitos das drogas utilizadas, os experimentos foram repetidos utilizando meio semi-definido (sem soro fetal e hormônios com adição apenas de BSA) com as mesmas drogas inibidoras e estimuladoras da via NO/GC/GMPc/PKG sobre a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos. O intuito foi de confirmar os resultados apresentados na fase 1 (aparente ausência de atuação dessa via na maturação nuclear), descartando fatores que poderiam estar mascarando os efeitos das drogas.

Para isso, em um primeiro momento, as mesmas concentrações foram utilizadas, mas em meio semi-definido (TCM 199 + 0,04% de BSA), sem a presença de soro ou hormônios e, em um segundo momento, alteramos as concentrações utilizadas. Os resultados estão apresentados abaixo.

5.7 Efeito do análogo de GMPc (8-Br-GMPc) sobre a maturação nuclear em meio semi-definido.

Diferentes concentrações do análogo do GMPc (0, 1, 2 e 4mM de 8-Br-GMPc) foram analisadas durante a MIV visando determinar seu efeito durante o período de 24 horas de maturação *in vitro*. Nesse estudo, usando um meio de cultivo semi-definido, a taxa de maturação continuou não sendo afetada pela 8-Br-GMPc, estando em torno de 95% (Tabela V.7), semelhante ao observado em meio de cultivo indefinido, com a presença de hormônios e soro, que havia apresentado 87% de metáfase II após 24h de cultivo (fase 1).

Tabela V.7: Maturação nuclear de oócitos submetidos à maturação *in vitro* por 24h em meio semi-definido na presença de diferentes concentrações de 8-Br-GMPc (análogo de GMPc).

8-Br-GMPc	Estádios da meiose		
	Oócitos n	Pré-MI ¹ n	Pós-MI ² n (% ± DP)
0 (controle)	54	2	52 (96 ± 8,3)
1 mM	62	3	59 (95,2 ± 0,4)
2 mM	65	4	61 (93,8 ± 10,3)
4 mM	65	3	62 (95,4 ± 9,1)

¹ oócitos em metáfase I (Pré-MI); ²oócitos em anáfase I, telófase I e metáfase II (Pós-MI), considerados maturados. Não houve diferença significativa entre os tratamentos (P>0,05). Resultados correspondentes a três repetições realizadas.

5.8 Efeito do inibidor de PKG (KT5823) sobre a maturação nuclear em meio semi-definido.

Diferentes concentrações do inibidor da proteína cinase dependente de GMPc (0, 0,1µM, 1µM e 10µM de KT 5823), foram acrescentadas durante a MIV, visando determinar o efeito da inibição de PKG no decorrer do período de 24 horas de maturação *in vitro*.

Observou-se que o tratamento com KT5823 em meio semi-definido resultou em uma taxa de maturação que variou de 88,7% a 94% sem diferenças significativas entre os tratamentos (P>0,05) (Tabela V.8) e bastante semelhante à taxa de maturação obtida com as mesmas concentrações em meio de cultivo indefinido, que foram de 85,5% a 90% (resultados alcançados na fase I).

Tabela V.8: Maturação nuclear de oócitos submetidos à maturação *in vitro* por 24h em meio semi-definido na presença de diferentes concentrações de KT5823 (inibidor de PKG).

KT 5823	Oócitos n	Estádios da meiose	
		Pré-MI ¹ n	Pós-MI ² n (% $\pm$ DP)
0 (controle)	61	4	57 (94 $\pm$ 11,06)
0,1 μ M	51	4	46 (90,6 $\pm$ 7,23)
1 μ M	61	7	52 (88,7 $\pm$ 6,5)
10 μ M	60	6	52 (90,2 $\pm$ 4,5)

¹ oócitos em metáfase I (Pré-MI); ²oócitos em anáfase I, telófase I e metáfase II (Pós-MI), considerados maturados. Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P>0,05$). Resultados correspondentes a três repetições realizadas.

Para confirmar a ausência de envolvimento do PKG na maturação oocitária de bovinos, utilizamos concentrações mais elevadas do inibidor (0, 10 μ M, 15 μ M e 20 μ M de KT 5823). Os resultados estão apresentados na Tabela V.9.

Com o uso de maiores concentrações de KT5823 em meio-semi definido, obteve-se taxas de maturação que variaram de 56,5% a 75,7% sem diferenças significativas entre os tratamentos ($P>0,05$), um pouco inferiores aos outros ensaios com a mesma droga, que foi em média de 91% nos tratamentos com menores concentrações em meio semi-definido (Tabela V.8) e em meio indefinido (fase I). Como os grupos não diferiram do controle, cuja taxa de maturação também foi mais baixa, provavelmente houve apenas uma variação na qualidade dos oócitos no período.

Tabela V.9: Maturação nuclear de oócitos submetidos à maturação *in vitro* por 24h em meio semi-definido na presença de concentrações mais elevadas de KT5823 (inibidor de PKG).

KT 5823	Oócitos n	Estádios da meiose	
		Pré-MI ¹ n	Pós-MI ² n (% ± DP)
0 (controle)	87	32	55 (63% ± 5,3)
10 µM	83	36	47 (56,5% ± 6,4)
15 µM	87	21	66 (75,7% ± 1,6)
20 µM	85	37	48 (56,7% ± 7,8)

¹ oócitos em metáfase I (Pré-MI); ²oócitos em anáfase I, telófase I e metáfase II (Pós-MI), considerados maturados. Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$). Resultados correspondentes a quatro repetições realizadas.

5.9 Efeito de maiores concentrações do inibidor de GC (OQD) sobre a maturação nuclear em meio semi-definido.

Diferentes concentrações do inibidor da guanilato ciclase (0, 100µM, 150µM e 200µM de OQD) foram avaliadas durante a MIV visando determinar o efeito da supressão da atividade da enzima de síntese de GMPc durante o período de 24 horas de maturação *in vitro*. Os resultados estão apresentados na Tabela V.10.

A inibição da GC não interferiu na capacidade do oócito de maturar *in vitro*, alcançando uma taxa de maturação de cerca de 70% para todos os tratamentos (0, 100µM, 150µM e 200µM), um pouco inferior à taxa de 83% alcançada com as menores concentrações anteriormente estudadas (0, 1, 10 e 100µM).

Tabela V.10: Maturação nuclear de oócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro* por 24h em meio semi-definido na presença de diferentes concentrações de OQD (inibidor de GC).

OQD	Oócitos n	Estádios da meiose	
		Pré-MI ¹ n	Pós-MI ² n (% ± EPM)
0 (controle)	79	19	60 (75,4 ± 5,1)
100 µM	83	25	58 (69,5 ± 4,7)
150 µM	89	23	66 (74,3 ± 2,3)
200 µM	91	24	67 (74,1 ± 6,6)

¹ oócitos em metáfase I (Pré-MI); ²oócitos em anáfase I, telófase I e metáfase II (Pós-MI), considerados maturados. Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P>0,05$). Resultados correspondentes a quatro repetições realizadas.

5.10 Efeito de super dosagens do inibidor de PKG (KT5823) e de GC (OQD) sobre a maturação nuclear em meio semi-definido.

Devido à ausência de efeitos dos inibidores de PKG e GC sobre a maturação espontânea dos oócitos bovinos, foi realizada uma tentativa de inibição com uma concentração bastante elevada dos diferentes agentes inibidores do nível de GMPc no meio de maturação semi-definido usados nos experimentos, para excluir que a ausência de efeito ocorra por concentração insuficiente dos inibidores e poder confirmar que era de fato pela não interferência dessa via na maturação.

De acordo com os resultados apresentados na tabela V.11, no tratamento que utilizou 100 µM de KT5823 obteve-se um bloqueio da maturação espontânea, apresentando apenas 11,3% de oócitos no estágio de metáfase II ($P<0,05$). Embora as células germinativas desse tratamento com a maior concentração do inibidor de PKG tenham saído do estágio de vesícula germinativa (GV), seu desenvolvimento não ultrapassou o estágio de metáfase I com 24 horas de cultivo. Para determinar se esse bloqueio era reversível ou não, após esse período, os oócitos desse grupo foram mantidos por mais 24 horas em um meio de maturação enriquecido com hormônios e soro fetal bovino. No entanto, mesmo apresentando células do *cumulus* expandidas e intactas, os oócitos não retomaram a meiose para seu completo desenvolvimento, indicando um bloqueio irreversível do ciclo celular (dados não apresentados). Provavelmente outras funções do oócito foram bloqueadas pelo tratamento, prejudicando a progressão até MII.

Tabela V.11: Maturação nuclear de oócitos submetidos à maturação *in vitro* 24h em meio semi-definido na presença de altas concentrações de KT5823 e de OQD.

	Oócitos n	Estádios da meiose	
		Pré-MI ¹ n	Pós-MI ² n (% ± EPM)
0 (controle)	63	11	52 (82,5% ± 3,2) ^a
500 µM OQD	63	22	41 (64,9% ± 5,5) ^b
50 µM KT5823	60	29	31 (51,7% ± 6,7) ^b
100 µM KT5823	62	55	7 (11,3% ± 1,5) ^c

¹ oócitos em metáfase I (Pré-MI); ²oócitos em anáfase I, telófase I e metáfase II (Pós-MI), considerados maturados. Diferenças significativas entre os tratamentos (P<0,05), representadas por letras diferentes. Resultados correspondentes a três repetições realizadas.

As menores concentrações dos inibidores, 500 µM OQD e 50 µM KT5823, apresentaram uma proporção similar de maturação (64,9 e 51,7%, respectivamente, P>0,05), mas também reduziram as taxas de maturação em relação ao controle (82,5%, P<0,05), embora não no mesmo nível que o tratamento com 100 µM de KT5823. Dessa forma, ao contrário dos resultados anteriores, a inibição da GC por 500 µM de OQD e a inibição da PKG por 50 µM de KT5823, reduziram a taxa de maturação após 24 horas, sugerindo que as concentrações utilizadas anteriormente de ambas as drogas, 1, 10, 100, 150 e 200µM de OQD e 0,1, 1, 10, 15 e 20µM de KT5823, haviam sido insuficientes, gerando uma inibição parcial da via GMPc. Esses resultados sugerem o envolvimento da PKG e da GC na progressão da maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

Fase 3 - Efeito da manipulação dos níveis de NO e da atividade de componentes da via GC/GMPc sobre a retomada da meiose de oócitos bovinos cultivados em meio semi-definido.

Nos experimentos anteriores, buscou-se fazer as avaliações de efeitos da manipulação de componentes da via GC/GMPc/PKG em um meio semi-definido para excluir a possibilidade de ausência de efeitos das drogas da fase 1 ter sido causada por componentes do meio indefinido utilizado, mascarando a ação das drogas testadas. Mesmo nessas condições, não foram observados efeitos na progressão da meiose até metáfase II, a não ser quando dosagens bem mais elevadas dos inibidores foram utilizadas. Desta forma, retomamos a análise dos efeitos dessa via na retomada da meiose, ou seja, no período de rompimento de vesícula germinativa.

5.11 Influência do NO sobre o rompimento da vesícula germinativa em meio semi-definido às 9 h de maturação

No experimento realizado anteriormente na Fase 1 em meio indefinido, o SNAP não causou efeito da taxa de rompimento da vesícula germinativa. Como mesmo no controle a taxa de RVG às 7h de cultivo de maturação foi relativamente baixa (36%), havia a possibilidade de que a cinética da retomada da meiose fosse mais lenta e que não estivéssemos observando efeito do SNAP por esse motivo, ou seja, o período de maior proporção de oócitos atingindo a fase de RVG seria depois das 7h de cultivo.

Assim sendo, nesse experimento foram avaliadas diferentes concentrações de SNAP (0, 10^{-9} , 10^{-8} e 10^{-7} M) adicionadas ao meio de maturação visando determinar o efeito do aumento de NO sobre a capacidade dos oócitos de retomar a meiose (taxa de RVG), após 9h de cultivo *in vitro*.

Tabela V.12: Taxa de rompimento da vesícula germinativa (RVG) após 9 h de maturação *in vitro* com diferentes concentrações do doador de óxido nítrico (SNAP).

SNAP	Oócitos n	Oócitos em RVG*
		n (% $\pm$ EPM)
0 (controle)	58	41 (70,2 $\pm$ 6,1) ^a
10^{-9} M	53	36 (68,1 $\pm$ 4,3) ^a
10^{-8} M	52	37 (71,9 $\pm$ 2,9) ^a
10^{-7} M	67	24 (35,8 $\pm$ 1,2) ^b

* Inclui os oócitos que romperam a vesícula ou atingiram a metáfase I. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$). Resultados correspondentes a três repetições realizadas.

Nesse experimento observou-se que o grupo controle e os tratamentos com 10^{-9} M e 10^{-8} M de SNAP apresentaram cerca de 70% ($P > 0,05$) de oócitos que romperam a vesícula germinativa, não havendo efeito dessas concentrações. No tratamento com a maior concentração do doador de NO (10^{-7} M de SNAP), porém, apenas 36% dos oócitos conseguiram alcançar o estágio de RVG ($P < 0,05$). Os resultados observados sugerem que enquanto concentrações mais baixas de NO não afetam a maturação nuclear, a concentração mais alta retardou o processo.

Além disso, os dados indicam que, de fato, a cinética da maturação em nossas condições foi mais lenta quando comparada à de relatos anteriores. Como já mencionado, com 7 h de cultivo (fase 1, meio de cultivo indefinido), 36% dos oócitos do grupo controle haviam retomado a meiose, enquanto que em estudo similar de Bilodeau-Goeseels (2007) já eram 78%, valor mais próximo ao observado em nosso sistema (70%), somente após 9 h de cultivo em meio semi- definido (fase 2, Tabela V.12). Dessa forma, em nossas condições de cultivo, a avaliação do rompimento da vesícula germinativa foi mais adequada após 9 horas de maturação. Na Figura V.1, apenas para efeito de comparação, pode-se observar os resultados das duas avaliações (7 e 9h de MIV, respectivamente) para a taxa de RVG nas diferentes concentrações de SNAP.

Figura V.1: Taxa de quebra da vesícula germinativa em oócitos de bovinos avaliados com 7 horas de desenvolvimento em meio indefinido (com a presença de SFB e hormônios – fase1) e avaliados com 9 horas de maturação em meio semi-definido (sem a presença de soro ou de hormônios – fase 2).

5.12 Efeito do estimulador de GC (Protoporfirina IX) e do análogo de GMPc (8-Br-GMPc) sobre a retomada da meiose em meio semi-definido.

Com a observação de efeito do aumento dos níveis de NO com o uso do SNAP, efetuamos a avaliação do efeito do estimulador da guanilato ciclase (Protoporfirina IX) e do análogo do GMPc (8-Br-GMPc), para verificar se o efeito do SNAP seria observado também com essas drogas, o que sugeriria a ação de NO via GC/GMPc no efeito observado sobre o RGv.

5.12.1 Efeito do estimulador de GC (Protoporfirina IX) sobre a retomada da meiose em meio semi-definido às 9 h de maturação.

Diferentes concentrações de Protoporfirina IX (0, 5, 10 e 50 μ M) ocasionaram queda na taxa de retorno à maturação, sendo que a média de RVG foi de 60% para os tratamentos e 80% para o grupo controle, sem a presença da droga ($P<0,05$). Os resultados estão apresentados na Tabela V.13.

Tabela V.13: Taxa de rompimento da vesícula germinativa (RVG) após 9 h de maturação em oócitos bovinos cultivados *in vitro* com diferentes concentrações de Protoporfirina IX (estimulador de GC) em meio semi-definido.

Protoporfirina IX	Oócitos	Oócitos em RVG*
	n	n (% $\pm$ EPM)
0 (controle)	68	53 (80 $\pm$ 3,5) ^a
5 μ M	71	43 (60,5 $\pm$ 1,9) ^b
10 μ M	70	45 (63,8 $\pm$ 3,8) ^b
50 μ M	62	34 (54,4 $\pm$ 1,5) ^b

* Inclui os oócitos que romperam a vesícula ou atingiram a metáfase I. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre os tratamentos ($P<0,05$). Resultados correspondentes a três repetições realizadas.

O estímulo à GC causou uma interferência sobre a taxa de quebra da vesícula germinativa, ou seja, uma queda significativa do número de oócitos que suplantaram o bloqueio meiótico, em todas as concentrações testadas.

5.12.2 Efeito do análogo de GMPc (8-Br-GMPc) sobre a retomada da meiose em meio semi-definido às 9 h de maturação.

O atraso no RVG, induzido pelo estimulador de GC (Protoporfirina IX), foi confirmado com a utilização do análogo do GMPc. Todas as concentrações utilizadas reduziram a proporção de oócitos que romperam a vesícula germinativa (37 a 42%), quando comparadas ao grupo controle que apresentou 62% de RVG ($P<0,05$), conforme descrito na Tabela V.14.

Tabela V.14: Taxa de rompimento da vesícula germinativa (RVG) após 9 h de maturação em oócitos bovinos cultivados *in vitro* com diferentes concentrações de 8-Br-GMPc (análogo de GMPc) em meio semi-definido.

8-Br-GMPc	Oócitos	Oócitos em RVG*
	n	n (% $\pm$ EPM)
0 (controle)	62	38(62 $\pm$ 5,2) ^a
1mM	64	33 (51,8 $\pm$ 8,3) ^b
2mM	66	28 (42,3 $\pm$ 1,5) ^b
4mM	68	25 (36,6 $\pm$ 3,5) ^b

* Inclui os oócitos que romperam a vesícula ou atingiram a metáfase I. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$). Resultados correspondentes a três repetições realizadas.

Portanto, a atividade da GC (estimulada pela Protoporfirina IX) e o GMPc (mimetizado pelo seu análogo) estariam influenciando de forma similar o retorno ao desenvolvimento meiótico dos oócitos de bovinos.

Considerando que o NO causou uma redução na retomada da meiose (Tabela V.12) e que o estimulador da GC e o análogo do GMPc tiveram efeitos similares, é plausível que a via NO/GC/GMPc esteja envolvida no processo de manutenção do bloqueio da meiose.

5.13 Mensuração de GMPc e AMPc em oócitos bovinos maturados *in vitro*.

De acordo com os resultados obtidos foi verificado um atraso na retomada da meiose quando os oócitos foram maturados com SNAP (doador de NO - Tabela V.12), com Protoporfirina IX (estimulador da GC – Tabela V.13) ou com 8-Br-GMPc (análogo de GMPc – Tabela V.14). Dessa forma, o efeito negativo que o NO provoca na retomada da meiose sugere a ação da via GC/GMPc em oócitos de bovinos, visto os efeitos similares observados com o estimulador de GC e com o análogo de GMPc. Nesse experimento, foi realizada a mensuração de GMPc e AMPc em oócitos tratados o doador de NO (SNAP) associado ou não ao inibidor de GC (OQD), durante as primeiras horas de maturação, período onde ocorrem as maiores alterações desses nucleotídeos.

5.13.1 Mensuração dos níveis de GMPc em oócitos nas horas iniciais da maturação *in vitro*.

O efeito do aumento do NO, gerado pelo SNAP, isolado ou associado com o inibidor de GC (OQD), durante as primeiras horas de cultivo, resultou nos resultados apresentados na Tabela V.15 e Figura V.2.

Tabela V.15: Mensuração dos níveis de GMPc em oócitos de bovinos cultivados com 10^{-7} M de SNAP (doador de NO) e 100 μ M de OQD (inibidor de GC) em diferentes tempos de maturação.

Tratamento	GMPc (pmol/oócito)			
	0 hora	1 hora	3 horas	6 horas
Controle	5,29 $\pm$ 2,0 ^{aA}	2,97 $\pm$ 1,3 ^{bB}	2,46 $\pm$ 0,2 ^{bB}	0,98 $\pm$ 0,22 ^{bB}
SNAP	-	4,51 $\pm$ 0,24 ^{BaB}	2,3 $\pm$ 0,5 ^{bB}	2,14 $\pm$ 0,6 ^{bB}
SNAP + OQD	-	1,54 $\pm$ 0,35 ^{bB}	1,38 $\pm$ 0,2 ^{bB}	0,07 $\pm$ 0,02 ^{bB}

Diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$), representadas por letras minúsculas e diferentes na mesma coluna. Diferenças significativas entre os tempos de maturação ($P < 0,05$), representadas por letras maiúsculas e diferentes na mesma linha. Para cada tratamento foi utilizado pool de 30 complexos-*cumulus* oócito (CCO). Resultados correspondentes a quatro repetições realizadas.

No início da maturação (0h), os níveis de GMPc foram de 5,29 pmol/oócito, sofrendo uma queda significativa logo na primeira hora de cultivo para 2,97 pmol ($P < 0,05$) nos oócitos do grupo controle e 1,54 pmol ($P < 0,05$) nos oócitos cultivados com associação de 10^{-7} M de SNAP (doador de NO) e 100 μ M de OQD (inibidor de GC), que não diferiram entre si ($P > 0,05$). Tal fato não ocorreu no grupo de oócitos cultivados apenas com SNAP, o qual se manteve com 4,51 pmol/oócito, semelhante ao grupo imaturo (0h de cultivo, $P > 0,05$). Portanto, o aumento de NO gerado pelo SNAP conseguiu manter estável o nível de GMPc durante a primeira hora de maturação, o que porém não ocorreu nas próximas horas, onde todos os tratamentos apresentaram níveis de GMPc reduzidos em relação ao grupo imaturo ($P < 0,05$). Os níveis de GMPc dos oócitos cultivados por 3h foram de aproximadamente 1,4 a 2,5 pmol ($P < 0,05$) e com 6h de 0,07 a 2,1 pmol ($P < 0,05$).

Esses resultados mostram que o aumento de NO exerce influência sobre o GMPc sendo esse processo revertido pela associação de SNAP com o OQD (inibidor de GC). Dessa forma, o NO tem ação pela via GC/GMPc em oócitos bovinos, mantendo o nível

desse nucleotídeo elevado durante a primeira hora de maturação, processo que pode ser responsável pelo atraso no rompimento da vesícula germinativa (RVG) observado anteriormente (Tabela V.12).

Figura V.2: Representação gráfica dos níveis de GMPc às 0, 1, 3 e 6 horas de maturação *in vitro*. (* diferença em relação à 0h, $P < 0,05$).

5.13.2 Mensuração de AMPc em oócitos nas horas iniciais da maturação *in vitro*.

O AMPc é um nucleotídeo importante para o controle da meiose e a queda de seus níveis é necessária para a retomada da meiose, assim sendo, nesse experimento foi avaliado o efeito do aumento do NO associado ou não ao inibidor de GC durante as primeiras horas de cultivo dos níveis de AMPc (Tabela V.16 e Figura V.3), de forma a averiguar se a via NO/GC/GMPc tem ação também sobre esse nucleotídeo.

Tabela V.16: Mensuração dos níveis de AMPc em oócitos de bovinos cultivados com 10^{-7} M de SNAP (doador de NO) e 100 μ M de OQD (inibidor de GC) com diferentes tempos de maturação.

AMPc (fmol/oócito)				
Tratamento	0 hora	1 hora	3 horas	6 horas
Controle	32,43 $\pm$ 9,3 ^A	11,7 $\pm$ 7,2 ^B	8,0 $\pm$ 3,5 ^B	18,3 $\pm$ 8,8 ^B
SNAP	-	12,4 $\pm$ 9,4 ^B	4,5 $\pm$ 3,3 ^B	10,1 $\pm$ 2,6 ^B
SNAP + OQD	-	15,9 $\pm$ 2,4 ^B	3,3 $\pm$ 0,3 ^B	7,4 $\pm$ 2,2 ^B

Não houve diferença de tratamento entre os grupos maturados (ausência das letras minúsculas - $P > 0,05$). Diferenças significativas entre os tempos de maturação ($P < 0,05$), representadas por letras maiúsculas e diferentes na mesma linha. Para cada tratamento foi utilizado pool de 10 complexos *cumulus*-oócitos (CCO). Resultados correspondentes a quatro repetições realizadas.

A queda nos níveis de AMPc, necessária para que haja a maturação oocitária, foi observada entre os oócitos dos grupos maturados que apresentaram 11,7 a 15,9 fmol de AMPc/oócito durante a primeira hora, 3,3 a 8,0 fmol/oócito durante a terceira hora e 7,4 a 18,3 durante a sexta hora de maturação, em relação aos do grupo imaturo que apresentaram 32,43 fmol de AMPc/oócito ($P < 0,05$ – Tabela V.16). Os tratamentos não causaram nenhuma diferença entre os grupos ($P > 0,05$). O acréscimo de SNAP ao meio de cultura, sozinho ou associado com OQD não alterou os níveis de AMPc, portanto o NO não afetou a maturação de oócitos bovinos por ação sobre os níveis de AMPc nas condições estudadas.

Figura V.3 Representação gráfica da queda do AMPc, durante o período de 0, 1, 3 e 6 horas de cultivo * 0h foi diferente de todos os outros grupos, $P < 0,05$).

5.14 Efeito do SNAP (doador de NO) e do OQD (inibidor da GC) na abundância relativa de transcritos dos componentes da via do GMPc (NOS2, NOS3, GUCY1B3, PKG2 e PDE5A) e AMPc (ADCY6, PKA1, PDE3A, PDE4D e PDE8A) em oócitos e células do *cumulus*.

Para determinar a influência do NO na expressão de genes de diferentes enzimas ou efetores das vias do NO/GMPc/AMPc, complexos *cumulus*-oócito (CCO) foram maturados em meio semi-definido, sem a presença de soro ou hormônios, com SNAP (doador de NO) ou SNAP com OQD (inibidor de GC). Pools de 22 COCs foram avaliados antes e após a maturação *in vitro* (24h de cultivo), de forma separada, em oócitos e células do *cumulus* dos mesmos CCO e a quantidade relativa de cada gene foi dada em relação ao grupo imaturo do respectivo gene.

A figura V.4 apresenta a expressão relativa dos transcritos dos genes das enzimas NOS2 e NOS3, isoformas responsáveis pela síntese de NO. As figuras V.5, V.6 e V.7 apresentam a expressão relativa dos genes ligados ao controle dos níveis de GMPc (GUCY1B3 e PDE5A) ou de uma das enzimas ativadas por ele (PKG2) e as figuras V.8, V.9, V.10 e V.11 apresentam a expressão relativa dos genes ligados ao controle dos níveis de AMPc (ADCY6, PDE3A, PDE4D e PDE8A) ou de uma das enzimas ativadas por ele (PKA1).

Figura V.4 Abundância relativa de transcritos das enzimas óxido nítrico sintase induzível (NOS2) e endotelial (NOS3) em oócitos e em células do *cumulus* do mesmo pool do complexo *cumulus* oócitos (CCO) após 24h de MIV com ou sem SNAP (10^{-7} M) e/ou OQD (100 μ M). Diferenças significativas representadas por letras diferentes ($P < 0,05$).

Os genes NOS2 e NOS3 foram detectados tanto em oócitos, como em células do *cumulus*. Em oócitos, observou-se uma expressão de NOS2 maior no grupo imaturo em relação aos maturados ($P < 0,05$) e o SNAP associado ou não ao OQD não afetou os transcritos para NOS2, que foram similares ao grupo maturado controle ($P > 0,05$), sugerindo que a redução dos transcritos seja um efeito do processo de maturação.

Em relação à NOS3 não houve redução após a maturação ($P > 0,05$), mas quando o SNAP, associado ou não ao OQD, foi adicionado ao meio de cultivo a redução foi observada ($P < 0,05$). Essa observação sugere que o próprio NO possa exercer um efeito de *feedback* negativo sobre essa isoforma e que a via GC/GMPc não esteja envolvida nesse efeito, visto a falta de efeito do OQD.

Em células do *cumulus*, a expressão de NOS2 apresentou aumento no grupo controle após o período de maturação ($P < 0,05$), o que foi revertido pelo uso do SNAP que

provocou a manutenção dos transcritos em níveis similares aos controles imaturos ($P>0,05$) e inferiores aos controles maturados ($P<0,05$). O processo de maturação parece promover um incremento na expressão de NOS2 nas células e tal incremento pode ser inibido pelo próprio NO (*feedback* negativo). Essa variação é parcialmente revertida pelo OQD o que indica envolvimento, ao menos em parte, da via GC/GMPc na ação de NO sobre os transcritos de NOS2, nesse compartimento. Em relação à expressão da NOS3 nas células, não houve diferenças nos grupos estudados.

Os resultados observados demonstram que as enzimas NOS2 e NOS3 se expressam de maneiras diferentes nos dois compartimentos do CCO e que o SNAP exerce uma função diferenciada sobre essas isoformas dependendo da célula estudada.

A influência do NO também foi estudada sobre a expressão dos genes GUCY1B3, (componente da GC relacionado à síntese de GMPc), PDE5A (responsável pela degradação do GMPc e ativada por GMPc) e PKG1 (enzima ativada por GMPc).

Figura V.5 Abundância relativa de transcritos do componente da enzima guanilato ciclase (GUCY1B3) em oócitos e células do *cumulus* do mesmo pool do complexo *cumulus* oócitos (CCO) após 24h de MIV com ou sem SNAP (10^{-7} M) e/ou OQD (100μ M). Diferenças significativas ($P<0,05$) estão representadas por letras diferentes.

A expressão da isoforma GUCY1B3 foi detectada em ambos os compartimentos do complexo *cumulus*-oócito. Em oócitos houve redução dos transcritos ($P<0,05$) após a maturação (figura V.5). Como o SNAP com ou sem OQD não afetou os transcritos de forma diferenciada (ambos os tratamentos foram similares ao controle maturado, $P>0,05$), essa redução parece ser relativa somente ao processo de maturação do oócito.

Nas células do *cumulus* houve redução nos transcritos, porém, esta não foi significativa em relação às células imaturas ($P>0,05$). O SNAP, porém, provocou redução

nos transcritos em relação ao grupo imaturo ($P < 0,05$), sugerindo que o NO possa inibir a transcrição desse gene, mas não completamente, visto que esse grupo foi similar ao controle maturado ($P > 0,05$). O OQD foi similar ao grupo SNAP ($P > 0,05$), indicando papel do NO por via independente de GC/GMPc.

Figura V.6 Abundância relativa de transcritos da enzima fosfodiesterase 5A (PDE5A) em oócitos e células do *cumulus* do mesmo pool do complexo *cumulus* oócitos (CCO) após 24h de MIV com ou sem SNAP (10^{-7} M) e/ou OQD (100 μ M).

A PDE5A foi detectada em oócitos e células do *cumulus* (figura V.6), porém sua expressão não foi afetada nos diferentes grupos ($P > 0,05$). Essa observação pode indicar que ao longo da maturação a PDE5A possa garantir a contínua degradação do GMPc que venha a ser gerado.

O gene PKG2 teve sua expressão aumentada no grupo de oócitos maturados em relação ao grupo imaturo ($P < 0,05$) e o SNAP (associado ou não com OQD) apresentou níveis mais baixos similares ao grupo imaturo ($P > 0,05$) e também inferiores ao grupo maturado controle ($P < 0,05$, figura V.7). A sua expressão em oócitos, portanto, parece ser afetada pelo NO que mantém após a MIV o mesmo nível de expressão como de oócitos imaturos e esse efeito não seria via GC/GMPc, pois o OQD não teve efeito.

Quanto à ausência dos transcritos dos genes nas células do *cumulus*, os mesmos possivelmente foram traduzidos ou degradados nestas células, ou ainda não são expressos nesse tipo celular. Outra possibilidade seria a baixa expressão não detectada sob nossas condições experimentais.

Figura V.7 Abundância relativa de transcritos da enzima proteína cinase dependente de GMP (PKG1) em oócitos e células do *cumulus* do mesmo pool do complexo *cumulus* oócitos (CCO) após 24h de MIV com ou sem SNAP (10^{-7} M) e/ou OQD (100μ M). Diferenças significativas ($P < 0,05$) estão representadas por letras diferentes.

Em relação ao controle dos níveis de AMPc foram analisados os genes ADCY6, envolvida na síntese do AMPc, a PDE3A, PDE4D e PDE8A envolvidas na degradação do AMPc e a PKA1 que é uma proteína dependente de AMPc para tornar-se ativa.

Figura V.8 Abundância relativa de transcritos da enzima adenilato ciclase, isoforma 6 (ADCY6) em oócitos e células do *cumulus* do mesmo pool do complexo *cumulus* oócitos (CCO) após 24h de MIV com ou sem SNAP (10^{-7} M) e/ou OQD (100μ M). Diferenças significativas, representadas por letras diferentes ($P < 0,05$).

A ADCY6 foi detectada em oócitos e células do *cumulus*. Observou-se um aumento deste transcrito apenas em oócitos maturados na presença de SNAP associado ao OQD ($P<0,05$) em relação aos demais grupos (imaturo, controle maturado e maturado apenas com SNAP), que mantiveram suas expressões mais baixas e similares entre si ($P>0,05$, figura V.8).

Em células do *cumulus*, houve um aumento na abundância relativa de transcritos de ADCY6 em todos os grupos maturados em relação ao grupo imaturo ($P<0,05$). Os grupos maturados foram similares entre si ($P>0,05$).

Figura V.9 Abundância relativa de transcritos das enzimas fosfodiesterase isoforma 3A (PDE3A) e 4D (PDE4D) em oócitos e células do cumulus do mesmo pool do complexo cumulus-oócito (CCO) após 24h de MIV com ou sem SNAP (10^{-7} M) e/ou OQD (100μ M). Diferenças significativas, representadas por letras diferentes ($P<0,05$).

A PDE3A foi detectada apenas em oócitos e a PDE4D apenas nas células do *cumulus* (figura V.9). A PDE3A manteve-se estável após a maturação, mas o SNAP provocou uma redução nos transcritos para esse gene ($P<0,05$) em relação ao controle imaturo. O grupo SNAP com OQD foi similar ao grupo apenas com SNAP ($P>0,05$). Em relação à PDE4D nas células do cumulus, o comportamento foi similar, com o grupo maturado semelhante ao imaturo ($P>0,05$) e o SNAP inferior aos controles imaturo e maturado ($P<0,05$). A adição de OQD ao grupo SNAP não alterou a expressão em relação ao grupo SNAP sozinho ($P<0,05$).

Figura V.10 Expressão relativa das enzimas fosfodiesterase 8 (PDE8A) em oócitos e células do *cumulus* do mesmo pool do complexo *cumulus* oócitos (CCO) após 24h de MIV com ou sem SNAP (10^{-7} M) e/ou OQD (100μ M). Diferenças significativas, representadas por letras diferentes ($P<0,05$).

A isoforma PDE8A foi detectada em oócitos e células do cumulus (figura V.10). O processo de maturação não afetou a quantidade de transcritos da PDE8A expressa nos grupos de oócitos ou células do cumulus, onde os grupos imaturo e controle maturado foram similares ($P>0,05$). Os grupos tratados com SNAP sozinho ou associado ao OQD apresentaram menor expressão desta isoforma ($P<0,05$) em relação ao controle imaturo e foram similares entre si ($P>0,05$), indicando o efeito inibitório do SNAP, mas não do OQD, na expressão da PDE8A.

Figura V.11 Expressão relativa da proteína cinase dependente de AMPc (PKA) em oócitos e células do *cumulus* do mesmo pool do complexo *cumulus* oócitos (CCO) após 24h de MIV com ou sem SNAP (10^{-7} M) e/ou OQD (100μ M). Diferenças significativas, representadas por letras diferentes ($P<0,05$).

A PKA1 foi detectada em oócitos e células do *cumulus* (figura V.11). Não houve expressão diferenciada em nenhum dos tratamentos em oócitos ($P>0,05$), porém, apresentou um comportamento distinto para todos os tratamentos em células do *cumulus*, ($P<0,05$). A PKA1 teve sua expressão aumentada no grupo de células maturadas ($P<0,05$) e a maturação com SNAP incrementou mais esse aumento ($P<0,05$), portanto, o NO exerceu influência na quantidade de transcritos. O aumento gerado pelo SNAP, porém, foi revertido no grupo de células SNAP/OQD, que apresentou redução nos transcritos ($P<0,05$). Dessa forma, a influência do NO parece ter sido exercida pela via GC/GMPc, fazendo com que a expressão voltasse a nível semelhante ao do grupo controle de células maturadas ($P>0,05$).

As tabelas V.17 e V.18 descrevem de uma forma resumida os resultados obtidos referentes à abundância relativa dos genes estudados.

Tabela V.17: Resumo dos resultados das vias que possam estar influenciando a transcrição dos genes alvos estudados nos oócitos e células do cumulus maturados in vitro.

Oócitos										
Via:	NOS2	NOS3	GUCY1B3	PDE5A	PKG2	ADCY6	PDE3A	PDE4D	PDE8A	PKA1
maturação	x (↓)		x (↓)	ns	x (↑)			ne		ns
NO		x (↓)		ns	x (↓)		x (↓)	ne	x (↓)	ns
GMP				ns		x (↑)		ne		ns

Células do <i>cumulus</i>										
Via:	NOS2	NOS3	GUCY1B3	PDE5A	PKG2	ADCY6	PDE3A	PDE4D	PDE8A	PKA1
maturação	x (↑)	ns		ns	ne	x (↑)	ne			x (↑)
NO	x (↓)	ns	x (↓)	ns	ne		ne	x (↓)	x (↓)	x (↑↑)
GMP		ns		ns	ne		ne			x (↓)

ne: gene não expresso no compartimento indicado

ns: resultado não significativo ($P>0,05$), não havendo efeito sobre a expressão

x: possível caminho de influência na transcrição dos respectivos genes.

↑ expressão aumentada - ↓ expressão diminuída

Tabela V.18: Resumo dos genes cuja abundância relativa foi afetada pelas vias estudadas nos oócitos e células do cumulus maturados in vitro em função do tratamento utilizado.

Oócitos		
Via	Gene	Efeito
Maturação (Controle)	NOS2	↓ - efeito do processo de maturação
	GUCY1B3	↓ - efeito do processo de maturação
	PKG2	↑ - efeito do processo de maturação
NO (SNAP)	NOS3	↓ - ação direta de NO
	PDE3A	↓ - ação direta de NO
	PDE8A	↓ - ação direta de NO
	PKG2	↑ - reverte o aumento da MIV, ação direta de NO
GMPc (SNAP + OQD)	ADCY6	↑ - GMPc diminuído permitiu a expressão
Células do cumulus		
Via	Gene	Efeito
Maturação (Controle)	NOS2	↑ - efeito do processo de maturação
	ADCY6	↑ - efeito do processo de maturação
	PKA1	↑ - efeito do processo de maturação
NO (SNAP)	NOS2	↓ - reverte o aumento da MIV, ação direta de NO
	GUCY1B3	↓ - ação direta de NO
	PDE4D	↓ - ação direta de NO
	PDE8A	↑↑ - incrementa o aumento da MIV, ação direta de NO
NO via GMPc (SNAP + OQD)	PKA1	↑ - reverte o aumento de NO, ação de NO via GMPc

Controle – maturação sem tratamento; SNAP – maturação com doador de NO; SNAP + OQD – maturação com o doador de NO associado ao inibidor de guanilato ciclase.

↑ expressão aumentada
↓ expressão diminuída

CAPÍTULO VI

RESUMO DOS RESULTADOS

6. RESUMO DOS RESULTADOS

- O doador de NO (10^{-9} a 10^{-7} M de SNAP) não teve efeito sobre a retomada da meiose às 7 h de MIV (taxa de RVG) ou sobre a progressão da meiose às 24 h de MIV (taxa de MII) em meio de maturação indefinido (com presença de soro fetal e hormônios).
- O inibidor de guanilato ciclase (1 a 100 μ M de OQD), o estimulador de guanilato ciclase (5 a 50 μ M de Protoporfirina IX), o análogo de GMPc (1 a 4 mM de 8-Br-GMPc) e o inibidor da proteína cinase dependente de GMPc (0,1 a 10 μ M de KT5823) não tiveram efeito sobre a progressão da meiose às 24 h de MIV (taxa de MII) em meio de maturação indefinido (com presença de SFB e hormônios).
- O 8-Br-GMPc, o KT5823 (0,1 a 20 μ M) e o OQD (100 a 200 μ M) não tiveram efeito sobre a progressão da meiose às 24 h de MIV (taxa de MII) em meio de maturação semi-definido, sem a presença de SFB e hormônios (inclusão apenas de BSA).
- O OQD e o KT5823 tiveram efeito quando utilizados em altas dosagens em meio semi-definido e resultaram em atraso (500 μ M de OQD e 50 μ M de KT5823) ou bloqueio irreversível da meiose (100 μ M de KT5823).
- Alta concentração de NO, gerada por 10^{-7} M de SNAP, acarretou um atraso no RVG às 9 h de maturação *in vitro*, enquanto que concentrações mais baixas de NO não alteraram a maturação nuclear.
- O estímulo à GC pela Protoporfirina IX interferiu sobre o RVG às 9 h de MIV em todas as concentrações estudadas (5, 10 ou 50 μ M), ocasionando uma queda significativa do número de oócitos que suplantaram o bloqueio meiótico.
- O atraso no RVG às 9 h de MIV também foi observado com todas as concentrações estudadas do análogo do GMPc (1, 2 e 4mM de 8-Br-GMPc).
- Uma redução significativa no nível de GMPc ocorreu durante a primeira hora de maturação, porém, a manutenção de níveis mais elevados de NO com 10^{-7} M de SNAP conseguiu impedir a queda nos níveis desse nucleotídeo, mantendo-os estáveis nesse período. Esse processo foi revertido pela associação do SNAP com o OQD (inibidor de

GC). Após 3 e 6 h de MIV os níveis de GMPc mantiveram-se baixos em todos os grupos estudados.

- Uma queda significativa na concentração de AMPc foi observada entre oócitos imaturos e oócitos maturados por 1, 3 e 6 horas de cultivo. O acréscimo de SNAP ao meio de cultura, sozinho ou associado com OQD não alterou os níveis de AMPc.
- A expressão de NOS2 diminuiu após a maturação dos oócitos, enquanto aumentou nas células do cumulus e a NOS3 ficou estável em ambos os compartimentos. O SNAP (doador de NO) reduziu a expressão de NOS2 em células do cumulus e a da NOS3 em oócitos. O OQD associado ao SNAP não teve efeito.
- A GUCY1B3 (unidade $\beta 1$ da enzima GC) sofreu redução de transcritos após a maturação nos oócitos e nas células do cumulus foi afetada somente pelo SNAP (redução).
- A PDE5 foi detectada em oócitos e células do *cumulus*, mas não é afetada pela maturação, SNAP ou SNAP + OQD.
- A PKG2 não foi detectada em células do *cumulus*, mas foi nos oócitos, sofrendo aumento da abundância relativa dos transcritos após a maturação. O SNAP inibiu tal aumento, provocando redução dos transcritos. A associação do OQD não teve efeito.
- A ADCY6 teve sua expressão influenciada apenas pelo SNAP associado ao OQD (mas não do SNAP isolado) em oócitos. Nas células do cumulus sua expressão variou (aumento) somente em função da maturação.
- A PDE3A foi detectada apenas nos oócitos e sofreu redução somente após tratamento com o SNAP.
- A PDE4D foi detectada apenas nas células do cumulus e sua expressão também foi inibida somente pelo SNAP.
- A PDE8A foi detectada nos oócitos e células do cumulus e em ambos os compartimentos o SNAP provocou redução de seus transcritos.
- A PKA1 não sofreu variação nos seus transcritos nos oócitos. Nas células do cumulus houve aumento de transcritos após a maturação, a qual foi incrementada pela presença de SNAP. A associação do doador de NO com o OQD reverteu o aumento observado, resultando em queda da abundância relativa dos transcritos de PKA1. é

expressa em oócitos e células do *cumulus* de CCOs maturados e sofre um aumento nas células do *cumulus* após a MIV.

CAPÍTULO VII

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliados os efeitos do NO e de componentes da via NO/GC sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos. Além disso, também foram verificados os efeitos da via NO/GC sobre os níveis de GMPc e AMPc e sobre a expressão de genes relacionados ao controle dos níveis dos nucleotídeos e de suas ações.

Na primeira fase do trabalho, diferentes concentrações de SNAP (doador de NO) foram utilizadas para investigar os efeitos da elevação dos níveis de NO sobre a retomada da meiose (taxa de RVG às 7 h de MIV) e a progressão da mesma (taxa de MII às 24 h de MIV). Além disso, foram avaliadas diferentes concentrações de um agente inibidor da guanilato ciclase (OQD), de um estimulador da guanilato ciclase (Protoporfirina IX), de um análogo do GMPc (8-Br-GMPc) e de um inibidor de proteína cinase dependente de GMPc (KT5823) na progressão de meiose para determinar se os componentes da via NO/GC/GMPc/PKG teriam influência sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos.

Os resultados mostraram que nenhum desses fatores interferiu na maturação nuclear, de modo que as taxas de RGV com diferentes concentrações de SNAP e as taxas de MII com diferentes concentrações de todas as drogas testadas (SNAP, OQD, Protoporfirina IX, 8-Br-GMPc e KT5823) não foram diferentes daquelas observadas nos grupos controles não tratados. Dessa forma, esses resultados indicariam que a via NO/GC/GMPc/PKG não teria ação no processo de maturação nuclear.

Para descartar que substâncias desconhecidas presentes no soro fetal e/ou os hormônios do meio de maturação pudessem interferir com a ação das drogas testadas, numa segunda fase do estudo foram repetidas algumas das avaliações anteriores (OQD, 8-Br-GMPc e KT5823 na taxa de MII) em meio de maturação semi-definido sem SFB e hormônios e apenas com inclusão de BSA como fonte de macromoléculas. Mais uma vez, não foram observados efeitos da manipulação dos componentes da via em estudo sobre a maturação dos oócitos. Somente quando dosagens elevadas de OQD e KT5823 foram utilizadas, houve um atraso na progressão da meiose, chegando até ao bloqueio irreversível da mesma na concentração elevada de KT5828.

A continuada ausência de efeito sugeria então a falta de atividade da via estudada e não um efeito de mascaramento ou inibição das drogas por substâncias presentes no soro ou pelos hormônios. Nessas condições, nem o NO e nem a via de sinalização mais comumente ativada por ele (GC/GMPc/PKG) teriam envolvimento com a maturação nuclear.

Viana et al (2007) relataram que o uso de um outro inibidor de NO (nitroprussiato de sódio – SNP) em concentrações similares às que foram utilizadas nesse estudo com o SNAP não alteraram a progressão da meiose às 24 h de MIV, similar ao observado em nossas condições. Por outro lado, Bilodeau-Goeseels (2007) observou estímulo ou inibição

à retomada da meiose às 7 h de MIV dependendo da concentração de SNP (baixa concentração foi estimulatória e alta concentração foi inibitória) e não obteve efeito na progressão até MII.

Esses resultados corroboram com nossas observações de não haver efeito do aumento de NO para a progressão à MII, mas contradiz a observação de que a retomada da meiose também não é afetada. Diferenças no cultivo (aditivos, concentração de drogas e uso de doadores diferentes) podem ter contribuído para essas variações entre os estudos. Além disso, avaliações anteriores em nosso laboratório mostraram que tanto a redução de NO via inibição de sua síntese com o inibidor de NOS (L-NAME), como o aumento dos níveis de NO com o SNAP causam redução na taxa de MII (SCHWARZ et al, 2008a,b), sugerindo que o NO tenha efeitos sobre a maturação nuclear.

A via de ação mais usual do NO ocorre pela ativação da GC com aumento nos níveis de GMPc e ativação da PKG (DENNIGER e MALERTTA, 2000). Quando estimulamos ou inibimos a atividade de GC (Protoporofirina IX e OQD, respectivamente) ou da PKG (8-Br-GMPc e KT5823, respectivamente) também não observamos efeito, de forma similar à falta de efeito da elevação do NO com SNAP. A falta de efeito da inibição da atividade de GC pelo OQD ou da inibição da PKG pelo KT5823 só foi revertida com concentrações maiores, sugerindo então, que as concentrações usadas tivessem sido insuficientes para causar algum efeito na maturação e que as atividades da GC e da PKG parecem ser necessárias para a progressão da meiose até MII.

Há poucos relatos sobre a manipulação dessas vias de sinalização em oócitos. Em bovinos, apenas o trabalho de Bilodeau-Goeseels (2007) mostrou também falta de efeitos dos mesmos agentes utilizados, porém, apenas na retomada da meiose; a progressão à MII não foi determinada e concentrações mais elevadas também não foram testadas. Em camundongos, o OQD sozinho também não afetou a meiose, mas reverteu a ação do doador de NO (SNP), de forma que foi sugerido que essa via é ativa na maturação espontânea (BU et al, 2004). No entanto, é provável que esta seja mais uma das diferenças no controle da maturação entre camundongos e bovinos (BILODEAU-GOEESELS, 2011)

De toda forma, como os efeitos inibitórios sobre a maturação só foram observados com concentrações muito elevadas das drogas, poderia estar ocorrendo também toxicidade ou interferência das drogas em outras vias do metabolismo dos oócitos. Assim sendo, voltamos a avaliar a ação do NO que não havia apresentado efeito na primeira fase, mas que já havia sido demonstrada anteriormente sua relação com o controle da maturação (SCHWARZ et al, 2008).

Conforme já mencionado, o estudo de Bilodeau-Goeseels (2007) mostrou um aumento na porcentagem de oócitos que retomaram a meiose com a utilização de baixa concentração de SNP (10^{-9} M) e uma redução com o aumento da concentração (10^{-7} e 10^{-5}

M). Essa variação nas taxas de RVG às 7 h de MIV não foi observada em nosso sistema de cultivo, embora concentração similar de outro doador utilizado neste estudo (10^{-8} M de SNAP) tenha sido testada. As diferenças observadas entre o nosso estudo e o de Bilodeau-Goeseels (2007) poderiam ser devidas às condições de cultivo distintas. No entanto, elas podem ser melhor explicadas pela cinética da maturação, que em nosso sistema pareceu ser mais lenta, visto que com 7h de cultivo apenas 36% dos oócitos do grupo controle haviam retomado a meiose, enquanto que no estudo de Bilodeau-Goeseels (2007) já eram 78%. Com isso, possivelmente não observamos efeitos na retomada da meiose por questão do momento de avaliação. Assim sendo, repetimos as avaliações com o doador de NO (SNAP) sobre a retomada da meiose (taxa de RVG), mas com 9 horas de maturação.

A aceleração na quebra da VG relatada por Bilodeau-Goeseels (2007) não foi observada em nossas condições, mesmo com 9 horas de maturação, mas por outro lado, a concentração mais elevada de SNAP (elevando os níveis de NO) resultou em redução das taxas de RVG, indicando um retardo na retomada da meiose. Assim sendo, o NO interfere com a retomada da meiose e às 9 h de MIV foi o momento mais adequado para observar esse efeito. Viana et al (2007) também observaram redução na retomada da meiose, mas apenas com concentrações mais elevadas de SNP (10^{-3} M) às 8 h de MIV.

Uma vez que foi observado o efeito da elevação do NO sobre a retomada da meiose avaliamos também se a GC, o GMPc e a PKG, efetores comuns na ação do NO, estariam envolvidos nesse processo. A utilização do estimulador da GC (Protoporfirina IX) e do análogo do GMPc também resultaram em redução das taxas de RVG às 9 h de MIV. O efeito do aumento do NO foi replicado pelo estímulo à GC e ao uso do análogo do GMPc, indicando a ação da via NO/GC/GMPc no retardo na retomada da meiose. Dessa forma, poder-se-ia dizer que essa via deve ser inativada para permitir a progressão da meiose, pois parece estar relacionada ao processo de manutenção do bloqueio meiótico em VG até que ocorra o estímulo necessário à maturação, removendo essa via inibitória. A necessidade de redução dos níveis de NO para permitir a retomada da meiose foi proposta por Sela-Abramovich et al (2008) que observaram que tal efeito seria dado pela via GC/GMPc em oócitos de ratas. Embora a ação da via GC/GMPc na sinalização do NO não tenha sido observada por Bilodeau-Goeseels (2007), nossos resultados são condizentes com a efetividade dessa sinalização também em bovinos.

Após a determinação do envolvimento do NO e da GC, buscou-se avaliar se essa via afetaria os níveis de GMPc e/ou AMPc, nucleotídeos já implicados com o controle da retomada da meiose. Os níveis de GMPc declinaram já na primeira hora de maturação e se mantiveram baixos às 3 e 6 horas de cultivo. A necessidade da redução dos níveis de GMPc para permitir a retomada da meiose já foi sugerida em roedores (TÖRNELL et al., 1990; SELA-ABRAMOVICH et al, 2008). Törnelli et al (1990) observaram que em oócitos de ratas,

os níveis de GMPc caem logo na primeira hora de cultivo de maturação e se mantêm baixos depois de duas horas. Em bovinos, há apenas o relato de Bilodeau-Goeseels (2007) que também observaram uma redução dos níveis de GMPc em oócitos bovinos no início da maturação, porém, mais tardia (após 3 h de MIV) que o observado no presente estudo (após 1 h de MIV). Assim sendo, nossos resultados reforçam a idéia de que também em bovinos esse nucleotídeo tenha envolvimento com a retomada da meiose.

A inclusão do SNAP ao meio de maturação reverteu a queda dos níveis de GMPc, mantendo-os em níveis similares aos do início do cultivo (0h de MIV) e a associação do OQD (inibidor de GC) impediu a manutenção dos níveis elevados de GMPc gerados pelo tratamento com o SNAP. Esses resultados mostram então que, o aumento dos níveis de NO provoca elevação do GMPc e que essa elevação é dada pela atividade da GC. Essa elevação, porém, tem curta duração (1 hora), visto que com 3 e 6 h os níveis de GMPc se mantiveram similarmente baixos em todos os grupos. Esses resultados são semelhantes aos de Bilodeau-Goeseels (2007), que usando o SNAP e OQD separadamente, relatou que o SNAP elevou os níveis de GMPc só no início do cultivo e o OQD reduziu.

No experimento avaliando a retomada da meiose, o SNAP (elevação de NO), a Protoporfirina IX (estimulador de GC para elevar GMPc) e o análogo do GMPc retardaram o processo com redução das taxas de RVG. Por sua vez, a dosagem de GMPc mostrou que o SNAP elevou seus níveis via GC. Dessa forma, pode-se inferir que altos níveis de NO provocam elevação dos níveis de GMPc de forma a manter os oócitos em VG.

Altos níveis de NO já foram relacionados à inibição da meiose em roedores HUO et al, 2005) e suínos (TAO et al, 2005), assim como a elevação de GMPc mantém os oócitos de camundongas em VG (ABBASI et al, 2009). Assim sendo, a manutenção do bloqueio meiótico pelo NO dada via GMPc em roedores (ABBASI et al, 2009; NAKAMURA et al, 2002; SELA-ABRAMOVICH et al, 2008) parece também ocorrer em bovinos.

Alguns estudos sugerem que o efeito do da via NO/GC/GMPc em manter o bloqueio meiótico seria dado por sua influência sobre a inibição da PDE3A, que levaria à manutenção de altos níveis de AMPc (BU et al, 2004; NORRIS et al, 2009; VACCARI et al, 2009; WANG et al, 2008) e não pela via clássica da PKG. Para averiguar essa possibilidade em bovinos foi realizada a mensuração dos níveis de AMPc

Nessa avaliação observou-se que os níveis de AMPc declinaram do mesmo modo em todos os grupos já na primeira hora de maturação, mantendo-se baixos também às 3 e 6 h de cultivo. Nossos resultados foram condizentes com Luciano et al. (2004), que ao cultivarem CCOs de bovinos em meio não suplementado com SFB e hormônios, obtiveram um nível de AMPc permanentemente baixo ao longo das 24 horas estudadas, com um declínio maior após 3 horas de cultivo.

Já em meio enriquecido com hormônios e soro, o contrário foi observado, com elevação dos níveis com pico alcançado às 3 horas seguida posteriormente de declínio até o final da maturação. Resultados semelhantes também foram obtidos em estudos com células do *cumulus* isoladas que apresentaram um aumento dos níveis de AMPc durante a primeira hora de maturação quando cultivadas em meio enriquecido com SFB, FSH e LH e não apresentaram diferenças quando cultivadas sem esses hormônios (LASTRO et al, 2003). Sabe-se que o FSH ativa receptores de membrana que estimulam a AC a sintetizar AMPc (RICHARD et al.1980), sendo esse um dos motivos da retirada desse hormônio do meio de cultivo utilizado no presente estudo, para evitar uma interpretação equivocada dos efeitos das drogas testadas.

O NO não influenciou os níveis de AMPc no início da maturação, visto que o SNAP não os manteve elevados e o mesmo declínio observado no grupo controle se deu com o aumento de NO. Em camundongos, a retomada da meiose mostrou-se dependente de uma queda inicial nos níveis de GMPc permitindo que a PDE3A torne-se ativa para reduzir também os níveis de AMPc (NORRIS et al, 2009; VACCARI et al, 2009). De acordo com novos resultados, este não parece ser o caso em bovinos, sugerindo que o controle dessas vias é diferente entre as espécies (BILODEAU-GOESEELS, 2011).

Pode-se dizer então, que a elevação de NO com SNAP estimula a atividade de GC resultando em aumento nos níveis de GMPc apenas na primeira hora de maturação e que a elevação do GMPc não afeta os níveis de AMPc. Esse aumento de GMPc por esse curto período, porém, foi suficiente para causar um retardo na retomada da maturação, mesmo com a queda do AMPc, de forma que há necessidade de redução dos dois nucleotídeos em paralelo para o adequado reinício da meiose e que não parece haver sobreposição, mas um paralelismo das vias GMPc e AMPc. Törnell et al (1990) relataram que o GMPc e o AMPc sofrem queda de seus níveis em paralelo na retomada da meiose em oócitos de ratas.

Visto que a via NO/GC interfere na regulação de meiose do oócito e que também pode afetar a expressão gênica, também avaliamos o efeito dessa via na abundância relativa de transcritos para genes envolvidos na sinalização celular do NO (enzimas de síntese de NO) e dos nucleotídeos GMPc e AMPc (enzimas de síntese e degradação dos nucleotídeos ou ativadas pelos mesmos). Assim, comparamos a expressão de oócitos imaturos e maturados sem tratamento (controle), com SNAP isolado (aumento de NO) ou associado à inibição de GC (com o OQD) para verificar se o efeito de SNAP era dependente da GC.

Observou-se que o NO afetou a expressão de 4 dos 9 genes detectados nos oócitos (NOS3, PKG2, PDE3A, PDE8A) e de 5 dos 8 genes detectados em células do *cumulus* (NOS2, GUCY1B3, PDE4D, PDE8A e PKA1). Somente a expressão de PKA1 nas células do *cumulus* se deu pela ação de NO via GC, visto que apenas para esse transcrito o OQD teve

efeito de reverter a ação do SNAP. Houve efeito apenas de GMPc na transcrição do ADCY6 dos oócitos, em que a manutenção de baixos níveis do nucleotídeo com OQD resultaram na elevação do transcrito. O processo de maturação isoladamente influenciou os transcritos de NOS2, GUCY1B3, PKG2 dos oócitos e NOS2, ADCY6 e PKA1 das células do *cumulus*.

Dentre os genes afetados pela maturação nos oócitos, dois deles sofreram redução (NOS2 e GUCY1B3) e um deles aumentou (PKG2), enquanto que os demais permaneceram estáveis. Este padrão está de acordo com estudos anteriores, em que a transcrição em oócitos pode permanecer estável (RACEDO et al. 2008) ou diminuir devido à tradução (VIGNERON et al. 2004) ou degradação específica (SU et al. 2006) durante a maturação. Porém, há contradições a respeito da ocorrência de transcrição após a retomada da meiose. Comparando oócitos imaturos e maturados *in vivo* de camundongos (CUI et al. 2007) e humanos (ASSOU et al. 2006) foi observado um aumento numa série de transcritos. No entanto, outros estudos comparando oócitos imaturos e maturados *in vitro* de bovinos (THELIE et al. 2009) e camundongos (SU et al. 2007) reportaram a ausência de transcrições durante a maturação. Dadas estas observações conflitantes e a oportunidade de se beneficiar de 92% da cobertura do genoma bovino (ELSIK et al. 2009), Mamo et al. (2011) confirmaram a existência da atividade transcricional durante a maturação *in vitro* e *in vivo* de oócitos de bovino, relacionada a genes com funções importantes na própria maturação, como os relacionados à sinalização celular.

A redução de NOS2 e GUCY1B3 sugere que a retomada da meiose na espécie bovina dependeria de uma queda nos níveis de NO e da conseqüente redução de atividade da GC e dos níveis de GMPc, similar ao que foi sugerido em ratos por Nakamura et al (2002). De acordo com Tripathi et al (2009), o NO derivado da NOS2, exerce influência em manter o bloqueio meiótico em estagio diplóteno em mamíferos e sua redução em resposta ao LH/hCG, diminui o nível de NO intraoócito, ocasionando o retorno ao desenvolvimento meiótico. Esses estudos suportam a hipótese de que a redução do NO, gerado pela NOS2, exerça uma função importante sobre o período de saída do bloqueio meiótico em oócitos de bovinos.

Em relação à PKG2, houve um aumento de sua expressão com a maturação dos oócitos, a qual foi revertida diretamente pelo NO. Em células de mamíferos o NO pode afetar a transcrição gênica, ao atuar sobre fatores de transcrição (WHITE et al. 2002). Em nosso caso, o NO exerceu tal efeito, controlando a expressão da PKG2 nos oócitos. Não há relato de sua expressão em oócitos, apenas um estudo de Sriraman et al (2006) relatou que a PKG2 foi expressa em células da granulosa e em CCO, não avaliando separadamente se oócitos e/ou células do *cumulus*. A PKG2 foi teve seus transcritos aumentados ao longo do

processo de maturação e foi relacionada com o processo de expansão do *cumulus* e ovulação.

A inibição da PKG em experimentos anteriores, não interferiu na taxa de maturação nuclear após 24 horas, porém sua alta expressão após esse período parece demonstrar sua importância em eventos mais tardios, provavelmente pós-MII, como fecundação ou ativação e/ou início do desenvolvimento embrionário. Petr et al. (2006) observaram que em oócitos de suínos, a inibição da PKG gerou uma queda na taxa de ativação por partenogénia, indicando a necessidade da PKG para ocorrer a ativação do oócito com saída do bloqueio em MII, normalmente proporcionada pelo espermatozóide (SIRARD et al. 2001). Em oócitos de camundongo, a ação do NO como protetor contra o envelhecimento de oócitos maturados foi reportada como sendo dada pela via PKG (GOUD et al, 2006). Essa possibilidade necessita ser avaliada em oócitos bovinos.

Nas células do *cumulus*, os transcritos NOS2, ADCY6 e PKA1 aumentaram, sendo NOS2 envolvido na síntese de NO e ADCY6 na síntese de AMPc e PKA1 ativado por AMPc. CCOs imaturos possuem as GJ íntegras, porém o desacoplamento das GJ precede a retomada da meiose (EPPIG et al. 1984). Em bovinos, após 3 horas de cultivo em meio não enriquecido com SFB, as *gap junctions* diminuem e após 6 horas ocorre o desaparecimento total (SUTOVSKY et al.1993). Ao final da MIV, as GJ já estão fechadas e não há transferência dos nucleotídeos GMPc e AMPc para o oócito, portanto, o alto nível de transcrito da ADCY6 nas células do *cumulus*, talvez seja responsável por sintetizar AMPc e possivelmente ativar a PKA1, que também foi elevada nessas células, de forma a exercer outras funções nesse próprio compartimento. Da mesma forma, o aumento de NO2 poderia ser relacionado a funções posteriores. Como já mencionado, o NO foi relacionado ao processo de ativação partenogénica e proteção contra o envelhecimento oocitário em oócitos já maturados (GOUD et al, 2006; PETR et al, 2006).

A ADCY6 é uma das isoformas da enzima de síntese de AMPc, a adenilato ciclase (AC). Foram identificadas dez isoformas de AC expressas em diferentes tecidos. Em bovinos não há relatos das isoformas específicas em oócitos, mas nas células do *cumulus* foram expressas as isoformas 1, 3, 4, 6 e 9 (LASTRO et al, 2006). As funções específicas de cada uma delas nessas células, porém, ainda não foram determinadas. Em oócitos há apenas um relato em roedores, em que foram detectadas as isoformas 3, 6, 7 e 9 (HORNER et al., 2003). De toda forma, confirmamos a ADCY6 em células do *cumulus* como relatado por Lastro (2006) e também em oócitos de bovinos.

Uma particularidade desse gene foi que seus transcritos em oócitos só variaram (aumentaram) no grupo maturado com o SNAP associado ao OQD (aumento de NO associado à inibição de GC para reduzir os níveis de GMPc). Esse fato sugere que o GMPc

possa ser um fator inibidor da transcrição da ADCY6 e que quando seus níveis diminuem essa transcrição possa ocorrer. O GMPc regula fatores de transcrição em outros tipos celulares além de influenciar a expressão gênica pós-transcrição (PILZ; BRODERICK, 2005). O nucleotídeo pode regular positivamente ou negativamente genes relacionados à proliferação celular, à apoptose, entre outros (PILZ; BRODERICK, 2005). A efetivação desse tipo de função em oócitos ainda deve ser avaliada.

A PKA é uma proteína cinase, ativada pelo AMPc (FARIN e RODRIGUES, 2004) e foi relacionada à manutenção dos oócitos em VG logo no início da maturação (RODRIGUEZ et al, 2002). Porém, não há estudos sobre seu papel em células do *cumulus* no final da maturação. A PKA1 tem funções relacionadas à inibição da proliferação celular e ao aumento de apoptose em outros tipos celulares (SKALHEGG; TASKÉN, 1997), restando ser avaliado se há um desempenho de tais funções também nas células do *cumulus*.

A PKA1 nas células do *cumulus* foi o único transcrito afetado pelo NO via GC, visto que o efeito de NO, dado pelo SNAP, foi revertido pela inibição da GC (OQD). A ação do NO sobre a PKA não é descrita em células do *cumulus*, porém, em células de músculo liso, Murthy et al (2001) observaram que a PKA é capaz de fosforilar a PDE5, aumentando a sua atividade, o que por sua vez, diminuiria o nível de GMPc. É possível que em células do *cumulus*, a PKA1 possa estar relacionada com o *feedback* sobre os níveis de GMPc.

O NO também é capaz de afetar atividades celulares por via direta sem ação da GC/GMPc por um processo de nitrosilação (PILZ; BRODERICK, 2005), o que parece ser o caso para a quase totalidade dos genes influenciados por ele. Além de o NO interferir na expressão dos genes das isoformas de sua síntese (inibiu NOS2 nas células do *cumulus* e NOS3 nos oócitos), o que poderia ser considerado um *feedback* negativo para reduzir níveis de próprio NO, também inibe a transcrição do gene da enzima de síntese do GMPc (GUCY1B3) nas células do *cumulus* e da proteína cinase ativada por GMPc (PKG2) nos oócitos, o que também sugere um *feedback* negativo para reduzir os níveis de GMPc e da enzima ativada por ele que é a efetora das ações da via. O NO, o GMPc, a PKG e até mesmo a PKA em algumas condições são efetores de mecanismos de *feedback* negativa para reduzir os níveis de GMPc (BRYAN et al., 2009; GARCÍA; BALTRONS, 2004; MURTHY et al., 2001).

Enzimas de degradação do AMPc também foram reduzidas diretamente pelo NO em oócitos (PDE3A e PDE8A) e células do *cumulus* (PDE4D e PDE8A) e somente nas células do *cumulus*, a enzima de síntese (ADCY6) foi aumentada. Essas observações indicam a capacidade do NO interferir nos níveis de AMPc de forma diferenciada dependendo do compartimento celular (aumenta em oócitos ou diminui em células do *cumulus*). O efeito da via NO/GC/GMPc sobre os níveis de AMPc ocorre em função do estágio da maturação

(retomada ou progressão), visto que no início da maturação, o NO não interferiu nos níveis de AMPc, mas no final interferiu com a transcrição de genes envolvidos na regulação desse nucleotídeo. O efeito do NO, via GC/GMPc sobre a atividade da PDE3A já foi relatada em murinos (NORRIS et al, 2009; VACCARI et al, 2009), mas não há descrição sobre a transcrição desses genes. Isso mostra, mais um nível de complexidade da via NO sobre o controle da maturação.

A PDE5A foi detectada em oócitos e células do *cumulus* e não foi influenciada pela maturação ou pelo NO em nenhum dos compartimentos celulares, mantendo-se estável em todas as condições. A PDE5A é responsável pela hidrólise do GMPc e é ativada pelo nucleotídeo, participando do *feedback* negativo do mesmo. Sua expressão foi relatada em oócitos e células do *cumulus* de camundongos (WANG et al., 2008) e em CCOs suínos (SASSEVILLE et al, 2008) e a manipulação de sua atividade influenciou a maturação. Não há relatos de sua detecção ou estudos de sua atividade em oócitos bovinos. No presente estudo, a manipulação de sua atividade não foi testada, mas como sua presença foi detectada em oócitos e células do *cumulus* é provável que tenha efeitos na maturação participando do controle dos níveis de GMPc.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

O aumento da disponibilidade de NO provoca retardo na retomada da meiose e esse efeito é mediado pela GC e pelo GMPc.

1. O NO eleva os níveis de GMPc no início da maturação, mas não os de AMPc. Mesmo havendo queda nos níveis de AMPc, a presença de níveis elevados de GMP é suficiente para ocasionar um retardo na retomada da meiose.
2. O NO e o GMPc podem atuar no controle da expressão gênica de uma série de enzimas envolvidas no controle dos níveis de GMPc e AMPc ou de suas funções. A alteração na expressão gênica pode ser um efeito direto do NO (PKG2, PDE3A, PDE4D e PDE8A), do GMPc (ADCY6) ou do NO via GMPc (NOS2 e PKA1) e varia com o compartimento considerado (oócito ou células do *cumulus*).

Essas observações demonstram a inter-relação das vias NO/GMPc/AMPc e toda a sua complexidade dependendo do tipo celular e da fase da maturação.

CAPÍTULO IX

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADONA, P.R.; LEAL, C.L.V. Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. **Zygote**, Cambridge, v.12, p.197-204, 2007.

BASINI, G. et al. Is nitric oxide an autocrine modulator of bovine granulosa cell function? **Reprod. Fertil. Dev.**, v.10, p.471-478, 1998.

BEHRENDTS, S.; HARTENECK, C.; SCHULTZ, G.; KOESLING, D. A variant of the alpha 2 subunit of soluble guanylyl cyclase contains an insert homologous to a region within adenylyl cyclases and functions as a dominant negative protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, p.21109-21113, 1995.

BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of manipulating the nitric oxide/cyclic GMP pathway on bovine oocyte meiotic maturation. **Theriogenology**, v.65, p.693-701, 2007.

BRYAN, N. S. Nitrite in nitric oxide biology: Cause or consequence? A systems-based review. **Free Radic Biol Med.** v. 41, p.691-701; 2006.

BU, S. et al. Nitric oxide influences the maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes cultured in spontaneous maturation medium and hypoxanthine-supplemented medium through different signaling pathways. **Mol. Cell. Endocr.** 2003b. In press.

BU, S. et al. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. **Mol. Cell Endocr.** v. 207, p.21-30, 2003a.

CHATTERJEE, S. et al. Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase-III in reproductive organs of female rats during the oestrous cycle. **Histochem J.**, London, v.28, p.715-23, 1996.

CHIARATTI, M. R., BRESSAN F. F., FERREIRA C. R., CAETANO, A. R., SMITH, L. C., VERCESI, A., MEIRELLES, F.V. Embryo mitochondrial dna depletion is reversed during early embryogenesis in cattle. **Biology of Reproduction**, v.82, p:76-85, 2010

CHMELÍKOVÁ, E. et al. The role of nitric oxide in meiotic maturation of porcine oocytes. In: International Congress on Animal Reproduction, Porto Seguro. UFBA, v.2 p.449, 2004.

CONTI, M. Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells. **Molecular endocrinology** (Baltimore, Md v.14, p.1317-1327; 2000.

CONTI M, ANDERSEN CB, RICHARD F, MEHATS C, CHUN SY, HORNER K, JIN C,

TSAFRIRI A. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Mol.Cell Endocrinol** v. 187,p.153–159, 2002.

CRAN, D.G.; ESPER, C.R. Cortical granules and the cortical reaction in mammals. **J.Reprod.Fertil.Suppl.** v.42, p.177-8, 1990

DENNINGER, J.W.; MARLETTA, M.A. Guanylate cyclase and the 'NO/cGMP signaling pathway. **Biochem Biophys Acta**, v.1441, p.334-350, 1999.

DEKEL N. Regulation of oocyte maturation. The role of cAMP. **Ann N Y Acad Sci.** v.541, p.211–216, 1988.

DEKEL N, BEERS WH. Rat oocyte maturation in vitro: relief of cyclic AMP inhibition with gonadotropins. **Proc Natl Acad SciUSA**;v.75, p:4369–73, 1978 .

DEKEL N, LAWRENCE TS, GILULA NB, BEERS WH. Modulation of cellto-cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulationof oocyte maturation by LH. **Dev Biol.** V.86,p: 86:356–362, 1981.

DE LOOS F., KASTROF P., VAN BENEDEN T.H., KRUIPT T.A. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. **Mol Reprod Dev.** v.28, p. 255-259, 1991.

EPPIG JJ. A comparison between oocyte growth in coculture with granulosa cells and oocytes with granulosa cell-oocyte junctional contact maintained in vitro. **J Exp Zool** ; v.209, p: 345–353, 1979.

EPPIG, J.J. Mamalian oocyte development. In ovarian endocrinology . **Blackwell Scientific Publications**, Oxford. v.(S.G. Hillier,ed). p. 107-131, 1991.

EPPIG JJ, DOWNS SM. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. **Biol Reprod.** v. 30, p:1–11, 1984.

GOREN, S.; DEKEL, N. Maintenance of meiotic arrest by a phosphorylated p34^{cdc2} is dependent of cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate. **Biol. Reprod**, v. 51, p.956-962, 1994

GRAZUL-BILSKA AT,REYNOLDS LP, REDMER DA, Gap junctions in the ovaries. **Biol Reprod** v.57, p: 947 957, 1197.

GREVE T, XU KP, CALLESEN H, HYTTEL P. In vivo development of in vitro fertilized bovine oocytes matured in vivo versus in vitro. **J In Vitro Fert Embryo Transf**; v.4, p:281–285, 1987.

HAN, S.J. et al. Protein kinase B/Akt phosphorylation of PDE3A and its role in mammalian oocyte maturation. **The EMBO J**, v.25, p.5716-5725, 2006

HATTORI, M.A. et al. Nitric oxide: a modulator for epidermal growth factor receptor expression in developing ovarian granulosa cells. **Cell Physiol**. v.39, C812-C818, 1996.

HATTORI, M.A. et al. Suppression of nitric oxide syhtesis in porcine oocytes. **J Mol Endocrin**. v.24, p.65-73, 2000.

HATTORI, M.A.; TAKESUE, K.; KATO, Y.; FUJIHARA, N. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the porcine oocyte and its possible function. **Mol Cell Biochem**. v.219, p.121-126, 2001.

HATTORI, M.A. et al. Estrogen regulation of nitric oxide synthesis in the porcine oocyte. **Mol Cell Endocrin**. v.260, p.13-19, 2004.

IZADYAR, F.; ZEINSTRA, E.; BEVERS, M.M. Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. **Mol Reprod Dev**. V.51, p.339-345, 1998.

JABLONKA-SHARIFF A, OLSON LM. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: Meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. **Endocrinology** v.138, p:2944, 2954, 1998.

JABLONKA- SHARIFF, A..J.; BASURAY, R.; OLSON, L.M. Inhibitors of nitric oxide sythase influence oocyte maturation in rats. **J. Soc. Gynaecol. Invest**. v.6, p.95-101, 1999.

JABLONKA- SHARIFF; OLSON, L.M. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. **Endocrinology**. Springfield, v.138, p.460-468, 1997.

JABLONKA- SHARIFF; OLSON, L.M. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. **Endocrinology**. Springfield, v.139, p.2944-54, 1998.

JABLONKA- SHARIFF; OLSON, L.M. Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes in vitro. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.55, p.412-21, 2000.

HEIKINHEIMO, O. and GIBBONS, W. E. The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. **Molecular Human Reproduction**. v.4, p.745-756, 1998.

KIM, N.H. et al. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during in vitro maturation. **Zygote**, v.8, n.1, p.25-32, 2000.

KIM H, MOON C, AHN M, LEE Y, KIM H, KIM S, HA T, JE Y, SHIN T. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the porcine ovary during follicular development. **J Vet Sci**. v.6, p:97–101, 2005.

KRUMENACKER, J. S.; HYDER, S. M.; MURAD, F. Estradiol rapidly inhibits soluble guanylyl cyclase expression in rat uterus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v. 98, p:717-722; 2001.

KUBELKA, M. et al. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, Without influencing chromosome condensation activity. **Biol Reprod**, v.62, p.292-302, 2000.

KUO, R.C.; BAXTER, G.T.; THOMPSON, S.H. STRCKER, S.A.; BONAVENTURA, J.; EPEL, D. NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization. **Nature**, v.406, p.633-6, 2000.

LAFOREST, M.F. et al. Fundamental significance of specific phosphodiesterases in the control of spontaneous meiotic resumption in porcine oocytes. **Mol Reprod Dev**, v. 70, p. 361-372, 2005.

LI, J.; BILLIAR, T.R. The role of nitric oxide in apoptosis. **Sem. Perinat**. v.24, p.46-50, 2000.

LIANG, C.G. et al. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent activation of mitogen-activated protein kinase in cumulus cells is essential for germinal vesicle breakdown of porcine cumulus-enclosed oocytes. **Endocrinology**, v.146, p.4437-4444, 2005.

LIU, Q.; S.S., G. Binding sites of nitric oxide synthases. **Methods Enzymol**. v. 268, p:311-324; 1996.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using relative quantitative PCR and the 2-DDC T method. **Methods**, San Diego, v.25, p.402-408, 2001.

LONERGAN P, RIZOS D, GUTIERREZ-ADAN A, FAIR T, BOLAND MP. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reprod**

Domest Anim. v.38, p:259–267, 2003.

LUCIANO, A.M., MODINA, S., VASSENA, R., MILANESI, E., LAURIA, A., GANDOLFIROLE, F. Intracellular Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Concentration and Oocyte-Cumulus Cells Communications on the Acquisition of the Developmental Competence During In Vitro Maturation of Bovine Oocyte. **Biology of Reproduction** . v.70, p. 465–472, 2004.

MASCIARELLI S, HORNER K, LIU C, PARK SH, HINCKLEY M, HOCKMAN S, NEDACHI T, JIN C, CONTI M, MANGANIELLO V. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. **J.Clin Invest**; v.114, p:196–205, 2004.

MATTA, S. et al. Effect of inhibition of synthesis of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide by aminoguanidine on the *in vitro* maturation of oocyte–cumulus complexes of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 111, p. 189-201, 2009.

MAYES, M.A.; SIRARD, M.A. Effect of type 3 and type 4 phosphodiesterase inhibitors on the maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest. **Biol Reprod**, v.66, p.180–184, 2002.

MERGIA, E.; RUSSWURM, M.; ZOIDL, G.; KOESLING, D. Major occurrence of the new $\alpha_2\beta_1$ isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. **Cellular signalling** v.15, p :189-195; 2003.

MITCHELL, L.M.; KENNEDY, C.R.; HARTSHORNE, G.M. Expression of nitric oxide synthase and effect of substrate manipulation of the nitric oxide pathway in mouse ovarian follicles. **Hum Reprod.**, Oxford, v.19, p.30-40, 2004.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev** v.43, p:109-142; 1991.

MOTLIK, J. et al. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. **Theriogenology**, v.49, n.2, p.461-469, 1998.

MURAD, F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. **The Journal of clinical investigation** v.78, p:1-5; 1986.

NAKAMURA, Y. et al. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. **Biol Reprod.**, Champaign, v.67, p.1588-92, 2002

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **Faseb. J.** v.6, p. 3051-64, 1992

NATORI, M.M. et al. Detecção da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em ovários

bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.33, supl. 31, p. 338, 2005.

NIMMEGEERS, S.; SIPS, P.; BUYS, E.; BROUCKAERT, P.; VAN DE VOORDE, J. Functional role of the soluble guanylyl cyclase alpha(1) subunit in vascular smooth muscle relaxation. **Cardiovascular research** v.76, p:149-159; 2007.

NISHIDA, N. et al. Critical role of nitric oxide in expression of porcine LH receptor at transcription and post-transcription levels. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, v.108, p.424-9, 2000.

NISHIKIMI, A. et al. Localization of nitric oxide synthase activity in unfertilized oocytes and fertilized embryos during preimplantation development in mice. **Reproduction**, Cambridge, v.122, p.957-63, 2001

NORRIS, R.P. et al. Luteinizing hormone causes MAPK-dependent phosphorylation and closure of Cx43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. **Development**, v. 135, p. 3229-3238, 2008.

NORRIS, R.P. et al. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development**, v. 136, p. 1869-1878, 2009.

PANDEY AN, TRIPATHI A, PREMKUMAR KV, SHRIVASTAV TG, CHAUBE SK. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. **Journal of Cellular Biochemistry** 111:521–528, 2010.

PAPAPETROPOULOS, A.; MARCZIN, N.; MORA, G.; MILICI, A.; MURAD, F.; CATRAVAS, J. D. Regulation of vascular smooth muscle soluble guanylate cyclase activity, mRNA, and protein levels by cAMP-elevating agents. **Hypertension** v.26, p:696-704; 1995.

PETR J, RAJMON R, CHMELÍKOVÁ E, TOMÁNEK M, LÁNSKÁ V, PRIBÁNOVÁ M, JÍLEK F. Nitric-oxide-dependent activation of pig oocytes: the role of the cGMP-signalling pathway. **Zygote** v.14, p.9-16, 2006.

PILZ RB, SUHASINI M, IDRIS S, MEINKOTH JL, BOSS GR. Nitric oxide and cGMP analogs activate transcription from AP-1-responsive promoters in mammalian cells. **Faseb,J**.v.9,p:552-558,1995.

PILZ RB, BRODERICK KE. Role of cyclic GMP in gene regulation. **Front Biosci**. V.10, p:1239-68,2005.

PINCUS G, ENZMANN EV. The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro. **J Exp Med** v. 62,p.:665–675, 1935.

PYRIOCHOU, A.; PAPAPETROPOULOS, A. Soluble guanylyl cyclase: more secrets revealed. **Cellular signalling** v.17, p:407-413; 2005.

RETTORI, V.; Mc CANN, S.M. Role of nitric oxide and alcohol on gonadotropin release in vitro or in vivo. **NY Acad. Sci.**, New York, v. 840, p.185-93, 1998.

RICHARD FJ, TSAFRIRI A, CONTI M. Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation. **Biol Reprod.** v.65, p:1444–1451, 2001.

RITTER, D.; TAYLOR, J. F.; HOFFMANN, J. W.; CARNAGHI, L.; GIDDINGS, S. J.; ZAKERI, H.; KWOK, P. Y. Alternative splicing for the alpha1 subunit of soluble guanylate cyclase. **The Biochemical journal** v.346, p:811-816; 2000.

ROUX, P.P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. **Microbiology and Molecular Biology**, Los Angeles, v. 68, p.320–44, 2004.

ROZEN,S. AND SKALELSKY,H.J. Bioformatics *Methods and Protocols*. **Molecular Biology Humana Press.**.. Totowa,N.J. p.365-368,2000.

RUSSWURM, M.; BEHREND, S.; HARTENECK, C.; KOESLING, D. Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. **The Biochemical journal** v.335, p.125-130; 1998.

SASSEVILLE, M. et al. Up-regulation of 3'5'-cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase in the porcine cumulus-oocyte complex affects steroidogenesis during in vitro maturation. **Endocrinology**, v. 149, p. 5568-76, 2008.

SCHILLER PC, MEHTA PP, ROOS BA, HOWARD GA. Hormonal regulation of intercellular communication: parathyroid hormone increases connexin 43 gene expression and gap-junctional communication in osteoblastic cells. **Mol Endocrinol** v.6, p:1433–1440, 1992.

SCHWARZ,K.L., PIRES, P., DE BEM,T.,ADONA,P.,LEAL,C.L. Consequences of nitric oxide synthase inhibition during bovine oocyte maturation on meiosis and embryo development. **Reprod Dom Anim** v.45,p. 75–80,2010.

SCHWARZ KR, PIRES PR, ADONA PR, CÂMARA DE BEM TH, LEAL CL. Influence of nitric oxide during maturation on bovine oocyte meiosis and embryo development in vitro. **Reprod Fertil Dev**.v.20, p:529-36, 2008.

SCHWARTZ, D. and SCHULTZ, R. Zygotic gene activation in the mouse embryo: involvement of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase and appearance of an AP-1-like activity. **Mol. Reprod. Dev.**, v.32, 209–216, 1992.

- SEDMIKOVÁ, M. et al. The effect of nitric oxide on porcine oocyte activation. In: international congress on animal reproduction: UFBA, 2004. v.2, p.450, 2004.
- SENGOKU, K. et al. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryos development, and trophoblast outgrowth in vitro. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.58, p.262-8, 2001.
- SELA-ABRAMOVICH, S. et al. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. **Endocrinology**, v. 147, p. 2280-2286, 2006.
- SHENG, J. et al. A. Dissection of c-mos degron. **The EMBO Journal**, v.21, p.6061-71, 2002.
- SIRARD MA, FIRST NL. In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. **Biol Reprod** v39, p:229–234, 1988.
- SIRARD MA Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**.v.55,p:1241-54, 2001.
- SIRARD MA, DESROSIER S, ASSIDI M. In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**_ V. 1, p:S71-6.,2007.
- SOTO, P.; NATZKE, R.P.; HANSEN, P.J. Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis: actions of lipopolysaccharide, prostaglandin F₂ α , and the nitric oxide generator, sodium nitroprusside dihydrate on oocyte maturation and embryonic development in cattle. **Am. J. Reprod. Immunol.**, Copenhagen, v. 50, p.263-72, 2003
- SUTOVSKY P, FLECHON JE, FLECHON B, MOTLIK J, PEYNOT N, CHESNE P, HEYMAN Y. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during in vitro culture of cattle oocyte cumulus complexes. **Biol Reprod**. v.49, p:1277–1287, 1993
- TAIEB, F.; THIBIE, R.C.; JESSUS, C. On cyclins, oocytes, and eggs. **Mol Reprod Dev**, v.48, p.397-411, 1997
- TAKESUE, K. et al. Expression of nitric oxide synthase-3 in porcine oocytes obtained at different follicular development. **J. Reprod. Dev.**, New York, v.49, p.135-40, 2003.
- TATSUMI, K. et al. Reference gene selection for real-time RT-PCR in regenerating mouse livers. **Biochem Biophys Res Commun**. v.374, p.106-10, 2008.
- TELFORD, N., WATSON, A. AND SCHULTZ, G. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Mol. Reprod**.

Dev., v.26, 90–100, 1990.

TESFAYE, D.A.; KADANGA, F.; BAUCH, K. The effect of nitric oxide inhibition and temporal expression patterns of the mRNA and protein products of nitric oxide synthase genes during in vitro development of bovine pre- implantation embryos. **Reprod. Dom. Anim.**, Oxford, v.41, p.501-09, 2006.

THOMAS RE, THOMPSON JG, ARMSTRONG DT, GILCHRIST RB. Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during in vitro maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. **Biol Reprod.** v.71, p:1142–1149, 2004.

TOMEK W, TORNER H, KANITZ W. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. **Reprod Domest Anim.** v.37, p:86-91, 2002.

TRANGUCH, S.; STEUERWALD, N.; HUET-HUDSON, Y.M. Nitric oxide synthase and nitric oxide regulation of preimplantation of embryo development. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.68, p.1538-44, 2003.

TRIPATHI A, PREM KUMAR KV, CHAUBE SK. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocyte **Cell Physiol** 223:592–600, 2010.

TSUTSUI M, H SHIMOKAWA, T MORISHITA, Y NAKASHIMA AND NYANAGIHARA. Development of genetically engineered mice lacking all three nitric oxide synthases. **J. Pharmacol Sci.** v.102, p.147–154, 2006.

VIVARELLI, E. et al. Meiotic resumption and intracellular cAMP levels in mouse oocytes treated with compounds which act on cAMP metabolism. **Cell Differ**, v. 12, p. 271-276, 1983.

WANG, Z.C.; SHI, F.X. Phosphodiesterase 4 and compartmentalization of cyclic AMP signaling. **Chinese Sci Bull**, v.52, p.34-46, 2008.

WEBB RJ, MARSHALL F, SWANN K, CARROLL J. Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in [cAMP] and protein kinase a in mammalian oocytes. **Dev Biol** . v. 246, p:441–454, 2002.

WIERSMA A, HIRSCH B, TSAFRIRI A, HANSEN RG, VAN DE KANT M, LOOSTERBOER HJ, CONTI M, HSUEH AJ. Phosphodiesterase 3 inhibitors suppress oocyte maturation and consequent pregnancy without affecting ovulation and cyclicity in rodents. **J Clin Invest** v. 102, p:532–537, 1998.

YI, Y.J.; PARK, C.S. Parthenogenetic development of porcine oocytes treated by ethanol, cycloheximide, cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine. **Animal Reproduction Science**, v. 86, p.297-304, 2005

ZHANG, M. et al. Gonadotropin-controlled mammal oocyte meiotic resumption. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p.282-296, 2009.