

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PEDRO RATTO LISBOA PIRES

**INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE NA VIA DA
ÓXIDO NÍTRICO SINTASE EM COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITOS
BOVINOS**

Pirassununga

2010

PEDRO RATTO LISBOA PIRES

**INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE NA VIA
DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE EM COMPLEXOS CUMULUS-
OÓCITOS BOVINOS**

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

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Lima Verde Leal.

Pirassununga

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

P667i Pires, Pedro Ratto Lisboa
Influência do hormônio foliculo estimulante na via da
óxido nítrico sintase em complexos cumulus-oócito
bovinos / Pedro Ratto Lisboa Pires. -- Pirassununga,
2010.
70 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Ciências Básicas.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.
Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Lima Verde Leal

1. FSH 2. Oócito bovino 3. Maturação *in vitro*
4. Óxido nítrico sintase 5. AMPc 6. GMPc. I. Título.

DEDICO ESTE TRABALHO:

Aos meus pais, **Eduardo e Mônica**, pelo apoio e suporte que sempre me ofereceram, pelo exemplo de vida e determinação, por nunca me deixarem desistir de meus objetivos e por sempre estarem aqui comigo.

Ao meu irmão **Tiago** pelo companheirismo, incentivo e me acolher em horas difíceis.

Aos meus avós **Benjamin e Celina** pelo apoio, carinho e dedicação em minha criação, proporcionando o que sou atualmente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, participaram e contribuíram para a realização deste trabalho, e de maneira especial:

À **Prof^a. Dr^a. Cláudia Lima Verde Leal** pela orientação, apoio, confiança em mim depositada, e pelo conhecimento a mim passado durante todo esse período de quase 6 anos sob sua orientação. Obrigado.

Ao **Dr. Paulo Roberto Adona**, que de forma resumida, foi como um mentor desde a minha graduação me ensinando a trabalhar, pesquisar e aprender tudo muito, tanto cientificamente como na vida. E por ser um companheiro, que mesmo com falando pouco, “fala muito”.

À minha namorada **Laís**, que em tão pouco tempo se tornou uma pessoa muito especial e essencial para mim.

À minha amiga e irmã **Lígia**, pela grande ajuda em todos os momentos que nunca me foi negada, e por ser a pessoa que é, e que considero como inspiração, em todos os aspectos, tanto no trabalho como na vida.

À **Kátia** que sempre participou ativamente de todas as atividades, sendo na prática ou intelectualmente em discussões durante o desenvolvimento de nossos projetos.

Ao amigo **Lucas** (Clodô) que é em nossas conversas e discussões sempre foi e ainda é uma pessoa com personalidade que contribui de forma positiva em todos os aspectos.

Ao **Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles** que de alguma forma sempre contribuiu cientificamente durante minha vivência no laboratório, e por me acolher sob orientação durante a ausência da Prof^a Dr^a Cláudia.

Ao **Prof. Dr. Heidge Fukumazu** pela atenção, ajuda e amizade durante o experimento.

A todos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Histologia Animal e Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) e agregados, **Alexandre (Alemão), André (Simprão), Simone, Tiago de Bem, Raquel, Marquinhos, Moyses, Felipe Percin, Fabiana (Martine), Rodrigo, Juliano, Luciano Remy, Luciano, Nilton Pedro, Giovana, Ricardo, Hernan, Gisele Mingotti, Isabelle, Paula, Sancho, Rodrigo (Bixu), Lilian Reno, Leo, Fabi, Paulinho, Zé Rodrigo.** Agradeço pela contribuição de vocês.

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

À **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos**, pela oportunidade e por proporcionar a realização do Mestrado.

RESUMO

PIRES, P.R.L.. **Influência do hormônio folículo estimulante na via da óxido nítrico sintase em complexos cumulus-oócito bovino**. 70f. 2010. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

O óxido nítrico (NO) é um mensageiro químico gerado pela atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) a qual foi detectada em vários órgãos incluídos os do sistema reprodutor e parece estar envolvido na maturação oocitária. No entanto, 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 nos níveis de outro nucleotídeo (AMPc) via fosfodiesterases (PDE). O AMPc é um importante elemento da via de sinalização do FSH nos complexos *cumulus*-oócitos e no controle da maturação oocitária. O objetivo do presente projeto foi investigar a influência do FSH na via do NOS/NO e seus componentes em oócitos bovinos maturados *in vitro* e o envolvimento das células do *cumulus* (CC) na via de sinalização. Para tanto, complexos *cumulus*-oócito (CCO) e oócitos desnudos (OD – maturados sem células do *cumulus*) foram maturados *in vitro* por 24h na presença ou ausência de FSH. As amostras foram avaliadas quanto a: 1) taxa da maturação nuclear; 2) níveis de produção de NO; 3) níveis de AMPc e GMPc; 4) abundância relativa de RNAm de NOS2, PDE5A, PDE6C, PKG1, PKG2, ADCY6, ADCY9, PDE3A e PKA1. O FSH, na concentração de 0,05UI/mL, estimulou positivamente a maturação nuclear em CCO e OD, com 80,6 e 89% de oócitos maturados, respectivamente. Quando comparados diretamente os grupos CCO e OD, o FSH não influenciou as taxas de maturação (71 e 71,3%, $p > 0,05$), nem os níveis de produção de NO (12,8 e 7,4 $\mu\text{M/mL}$, $p > 0,05$). Os níveis de GMPc em CCO aumentaram após 1 e 3 h de MIV na presença de FSH (266,3 e 187,2 pmol/pool com FSH e 240,5 e 168,5 pmol/pool sem FSH, respectivamente, $p < 0,05$). Após 6 h os níveis de GMPc declinaram de forma mais acentuada no grupo sem FSH (46,3 e 106,9 pmol/pool, com e sem FSH, respectivamente, $p < 0,05$). Os níveis de AMPc em CCO também foram mais elevados na presença de FSH à 1 e 3 h de MIV (7,60 e 7,81 pmol/pool, respectivamente) em comparação com CCO maturados sem FSH (0,30 e 0,76 pmol/pool, respectivamente, $p < 0,05$). Após 6h, os níveis declinaram e foram

similares para ambos os grupos (0,43 pmol/pool, $p > 0,05$). Em relação à expressão dos genes selecionados, todos foram detectados nos oócitos (CCO e OD), porém, em células do *cumulus*, foram detectados apenas PDE5A, ADCY6, ADCY9 e PKA1. Quando observados os resultados do grupo CCO, apenas os genes PKG1, ADCY6 e PDE3A sofreram influência do FSH ($p < 0,05$), apresentando um aumento destes transcritos. No grupo OD, apenas o gene PKG1 sofreu influência do FSH, também apresentando um aumento destes transcritos ($p < 0,05$). Em células do *cumulus*, os genes ADCY6 e ADCY9 sofreram influência do FSH, sendo que para a ADCY6 provocou um aumento destes transcritos, e para a ADCY9 provocou uma queda dos mesmos ($p < 0,05$). Em conclusão, o FSH pode exercer influência positiva na maturação nuclear de oócitos bovinos, agindo sobre os níveis de GMPc e AMPc, mas não sobre o NO. O FSH pode influenciar a expressão gênica em oócitos e em células do *cumulus* de bovinos.

Palavras-chave: FSH, oócito bovino, maturação *in vitro*, óxido nítrico sintase, AMPc, GMPc.

ABSTRACT

PIRES, P.R.L. **Influency of follicular stimulant hormon on the nitric oxide pathway in bovines *cumulus*-oocyte complex.** 70f. 2010. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

Nitric oxide (NO) is a chemical messenger generated by the nitric oxide synthase (NOS) enzyme, which was detected in several organs including the reproductive system and appears too involved in oocyte maturation. However, there are few studies on the role of this system in bovine oocytes. NO is known to act via guanylate cyclase (GC) stimulating the production of the nucleotide cGMP, which in turn is capable of influencing the levels of another nucleotide, cAMP via phosphodiesterases (PDE). cAMP is an important factor in FSH signaling in cumulus-oocyte complexes (COC) for the control of maturation. The aim of the present work

was to investigate the influence of FSH on the NOS/NO pathway and its components in bovine oocytes matured *in vitro* and the involvement of cumulus cells (CC) in the signaling pathway. COC and denuded oocytes (DO – matured without cumulus cells) were matured *in vitro* for 24 h with or without FSH. Samples were assessed for: 1) maturation rate; 2) levels of NO production; 3) levels of cGMP and cAMP; 4) relative abundance for mRNA of NOS2, PDE5A, PDE6C, PKG1, PKG2, ADCY6, ADCY9, PDE3A and PKA1. FSH positively stimulated oocyte maturation at 0.05UI/mL concentration for both COC and OD (80.6 and 89% maturation rates, respectively). When COC and OD were compared directly, FSH did not affect maturation rates (71 and 71.3%, $p>0.05$) nor NO production levels (12,8 and 7,4 $\mu\text{M/mL}$), $p>0.05$. cGMP levels increased after 1 and 3 h *in vitro* maturation (IVM) with FSH (266.3 and 187.2 pmol/pool with FSH and 240.5 and 168.5 pmol/pool without FSH, respectively, $p<0.05$). After 6 h IVM, cGMP levels in COC declined more in the group cultured with FSH (46.3 and 106.9 pmol/pool, with and without FSH, respectively, $p<0.05$). cAMP levels in COC were also increased in the presence of FSH at 1 and 3 h IVM (7.60 and 7.81 pmol/pool, respectively) in comparison to COC cultured without the hormone (0.30 and 0.76 pmol/pool, respectively, $p<0.05$). After 6 h, the levels declined and were similar for both groups (0.43 and 0.02 pmol/pool, $p>0.05$). Regarding mRNA expression for the selected genes, all of them were detected in oocytes, but only four of them were detected in cumulus cells: PDE5A, ADCY6, ADCY9 and PKA1. For COC only PKG1, ADCY6 and PDE3A were influenced by FSH ($p<0.05$), with an increase in transcript relative abundance, For DO, only PKG1 was influenced by FSH and also showed an increase in these transcripts ($p<0.05$). In cumulus cells, ADCY6 and ADCY9 were affected by FSH, with an increase for ADCY6 and a decrease in ADCY9 transcripts ($p<0.05$). In conclusion, FSH may positively influence nuclear maturation, acting on cGMP and cAMP levels, but not on NO. FSH may also influence gene expression in bovine oocytes and cumulus cells.

Keywords: FSH, bovine oocyte, *in vitro* maturation, nitric oxide synthase, cAMP, cGMP.

LISTA DE FIGURAS

- Figura IV.1.** Curva padrão de amplificação para o gene PPIA, por PCR em tempo real para oócitos maturados em diluições 1:1..... 19
- Figura IV.2.** Modelo esquemático do delineamento experimental..... 23
- Figura V.1.** Taxa de maturação referentes aos tratamentos e concentrações dos grupos CCO (A) e OD (B)..... 26
- Figura V.2.** Níveis de nitrito ($\mu\text{M}/\text{mL}$) produzidos por CCO e OD maturados na presença (+) ou na ausência (-) de FSH. Não houve diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$). Resultados de 4 repetições 29
- Figura V.3.** Níveis de GMPc produzidos por CCO maturados na presença ou na ausência de FSH às 0, 1, 3 e 6 h de MIV. * indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos dentro de um mesmo horário. 30
- Figura V.4.** Níveis de AMPc produzidos por CCO maturados na presença ou na ausência de FSH às 0, 1, 3 e 6 h de MIV. * indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos dentro de um mesmo horário..... 32
- Figura V.5.** Abundância relativa de transcritos e erro padrão do gene NOS2 estimado pelo PCR em tempo real. (A) Oócitos maturados com suas células do cumulus (CCO) ou sem as mesmas (OD) por 24 h em meio de MIV com (+) ou sem (-) FSH. (B) Células do cumulus (CC) dos respectivos CCOs. As barras de erro nas colunas indicam variações entre as repetições de cada grupo. Letras diferentes dentro do mesmo gráfico apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$)... 39
- Figura V.6.** Abundância relativa de transcritos e erro padrão dos genes PKG1, PKG2, PDE6C e PDE5C estimados pelo PCR em tempo real. (A) Oócitos maturados com suas células do cumulus (CCO) ou sem as mesmas (OD) por 24 h em meio de MIV com (+) ou

sem (-) FSH. (B) Células do cumulus (CC) dos respectivos CCOs. As barras de erro nas colunas indicam variações entre as repetições de cada grupo. Letras diferentes dentro do mesmo gráfico apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$) 40

Figura V.7. Quantidade relativa e erro padrão dos genes ADCY6 e ADCY9 estimado pelo PCR em tempo real. As barras de erro nas colunas indicam variações entre as repetições de cada grupo. Letras diferentes dentro do mesmo gráfico apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). 41

Figura V.8. Quantidade relativa e erro padrão dos genes PKA1 e PDE3A estimado pelo PCR em tempo real. As barras de erro na coluna de controle indicam variações entre as repetições de cada grupo. Letras diferentes dentro do mesmo gráfico apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). 42

LISTA DE TABELAS

Tabela IV.1. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação relativa dos genes selecionados. 20

Tabela V.1. Taxas de maturação nuclear de oócitos submetidos a maturação *in vitro* por 24 h com diferentes concentrações de FSH e na presença (CCO) ou ausência (OD) de suas células do cumulus durante o cultivo.. . 25

Tabela V.2. Taxas de maturação nuclear de oócitos submetidos à maturação *in vitro* por 24 h na presença (CCO) ou ausência (OD) de suas células do *cumulus* durante o cultivo, suplementado com 0,05UI/mL de FSH.. . 28

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO | 1 |
| <i>1. Introdução.....</i> | <i>2</i> |
| REVISÃO DE LITERATURA..... | 4 |
| <i>2. Revisão de Literatura</i> | <i>5</i> |
| <i>2.1. Maturação oocitária</i> | <i>5</i> |
| <i>2.2. Hormônio Folículo Estimulante.....</i> | <i>7</i> |
| <i>2.3. Sistema NOS/NO.....</i> | <i>7</i> |
| <i>2.4. AMPc e GMPc.....</i> | <i>9</i> |
| OBJETIVOS | 11 |
| <i>3. Objetivos.....</i> | <i>12</i> |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 13 |
| <i>4. Material e Métodos</i> | <i>14</i> |
| <i>4.1. Local de experimento.....</i> | <i>14</i> |
| <i>4.2. Reagentes e meios</i> | <i>14</i> |
| <i>4.3 Obtenção dos oócitos.....</i> | <i>14</i> |
| <i>4.4 Maturação in vitro</i> | <i>14</i> |
| <i>4.5 Determinação da taxa de maturação.....</i> | <i>15</i> |
| <i>4.6 Determinação da produção de NO pelo método de Griess</i> | <i>15</i> |
| <i>4.7 Determinação dos níveis de AMPc e GMPc</i> | <i>16</i> |
| <i>4.8. Reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT PCR).....</i> | <i>16</i> |
| <i>4.8.1. Análise dos dados da PCR</i> | <i>17</i> |
| <i>4.9. Delineamento Experimental</i> | <i>20</i> |
| <i>4.10. Análise Estatística</i> | <i>21</i> |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 24 |
| <i>5. Resultados e Discussão.....</i> | <i>25</i> |

| | |
|--|-----------|
| <i>5.1. Experimento 1: Efeito de diferentes concentrações de FSH na taxa de maturação nuclear in vitro CCO e OD.....</i> | <i>25</i> |
| <i>5.2. Experimento 2:Influência do FSH e das células do cumulus na produção de NO.....</i> | <i>27</i> |
| <i>5.3. Experimento 3: Influência do FSH nos níveis dos nucleotídeos GMPc e AMPc.....</i> | <i>30</i> |
| <i>5.4. Experimento 4: Influência do FSH e das células do cumulus na expressão de genes das vias do NO, GMPc e AMPc.....</i> | <i>33</i> |
| CONCLUSÕES..... | 43 |
| <i>6. Conclusões</i> | <i>44</i> |
| REFERÊNCIAS | 45 |
| <i>7. Referências</i> | <i>46</i> |

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A maturação oocitária é o processo em que envolve diversas alterações ultra-estruturais, moleculares e bioquímicas, preparando o oócito para a fecundação e o posterior desenvolvimento embrionário (RIZOS et al, 2002; RODRIGUEZ e FARIN 2004). Este processo é de extrema importância para aplicações na biotecnologia da reprodução, visto que para a produção *in vitro* de embriões (PIV) em mamíferos, o processo de maturação é uma etapa essencial para o sucesso dessas biotécnica.

As alterações observadas na maturação ocorrem tanto no oócito (núcleo e citoplasma) como em suas células do cumulus, que estão estreitamente envolvidas no processo (RODRIGUEZ e FARIN, 2004; GILCHRIST et al. 2004). O processo de maturação é controlado por diversas vias, com funções de inibição ou estimulação (PIRES et al. 2009) e dentre elas temos o sistema óxido nítrico sintase/óxido nítrico (NOS/NO).

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) (FLORA FILHO E ZILBERSTEIN, 2000). Na esfera reprodutiva a NOS foi identificada em vários órgãos como ovário, oviduto, útero e também em embriões, oócitos e espermatozóides e tem sido relacionada a diversas funções reprodutivas como desenvolvimento folicular, maturação oocitária e reação acrossômica (camundongas, JABLONKA-SHARIFF e OLSON, 1998; JABLONKA-SHARIFF e OLSON, 2000; ratas, JABLONKA-SHARIFF et al. 1999). 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.

Recentemente, evidenciamos a presença da proteína NOS3 em tecido ovariano bovino, em oócitos bovinos imaturos e maturados *in vitro*. 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 et al. 2007, SCHWARZ et al. 2008, ADONA et al. 2007; Pires et al. 2009)

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, é um dos principais responsáveis pelo controle da maturação meiótica de oócitos, sendo um segundo mensageiro da via de sinalização das gonadotrofinas (RODRIGUEZ e FARIN, 2004).

O FSH parece também exercer um papel importante na maturação oocitária. Hattori et al. (2000) observaram que o FSH é capaz de suprimir a síntese de NO em oócitos suínos, embora a quantidade da proteína para NOS3 tenha se mantido constante durante a maturação. Por outro lado, Pires et al. (2009) observaram que a quantidade de proteína de NOS2 e NOS3 foram alteradas após a maturação e/ou bloqueio meiótico por 24 horas, sugerindo que o FSH tenha alguma influência na produção da NO.

Considerando que o sistema NOS/NO pode atuar na maturação de oócitos e que o FSH possa afetar esse sistema, neste trabalho investigamos a influência do FSH e a mediação das células do *cumulus*, sobre a NOS/NO e as vias de sinalização (GMPc e AMPc) potencialmente afetadas na maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Maturação oocitária

A maturação oocitária *in vivo* tem início logo após o pico de LH, ocasionando a retomada da meiose e dando continuidade à meiose que estava bloqueada na prófase I. *In vitro*, o processo é semelhante, porém, logo após a retirada do oócito do ambiente folicular, o bloqueio natural da meiose exercido pelo conjunto de células da granulosa e células do *cumulus* é cessado (HAUGHIAN et al. 2004).

A maturação oocitária é o processo em que envolve diversas alterações ultra-estruturais, moleculares e bioquímicas, preparando o oócito para a fecundação e o posterior desenvolvimento embrionário (RIZOS et al. 2002; RODRIGUEZ E FARIN 2004). Tais alterações ocorrem tanto no oócito (núcleo e citoplasma) como em suas células do cumulus, que estão estreitamente envolvidas no processo (RODRIGUEZ E FARIN 2004; GILCHRIST et al. 2004). Desta forma, podemos compreender a maturação oocitária em dois aspectos, chamados maturação nuclear e maturação citoplasmática.

A maturação nuclear refere-se aos eventos que ocorrem da retomada da meiose do estágio de vesícula germinativa (prófase I) ao término da segunda divisão meiótica (metáfase II), tendo a condensação da cromatina e a quebra do envelope nuclear como eventos marcantes da maturação nuclear (MEINECKE et al. 2001; JONES et al. 2004).

A maturação citoplasmática envolve as modificações bioquímicas, moleculares e ultra-estruturais que ocorrem no citoplasma como preparação do oócito para a fertilização e o desenvolvimento embrionário posterior (STOJKOVIC et al. 2001). As modificações ultra-estruturais se referem basicamente a uma reorganização citoplasmática evidenciada pela migração de organelas, em especial as mitocôndrias e os grânulos corticais. Essas organelas se localizam mais periféricamente em oócitos bovinos imaturos e migram durante a maturação para uma posição perinuclear (HYTTEL et al. 1997; SUN et al. 2001). Os grânulos corticais, ao contrário, situados mais internamente em oócitos imaturos, migram para uma posição periférica juntamente à membrana citoplasmática. A migração dos mesmos é de extrema importância para a reação cortical, modificação de receptores e endurecimento da zona pelúcida para evitar a polispermia (CRAN E ESPER 1990;

ADONA et al. 2007). Toda essa reorganização ultra-estrutural do citoplasma é dependente dos microtúbulos e microfilamentos, que dão suporte para que as mesmas possam ser deslocadas no citoplasma (HYTTEL et al. 1997).

As modificações bioquímicas e moleculares são evidenciadas por processos traducionais de RNAm específicos resultando na síntese de enzimas e proteínas reguladoras das vias de controle do mecanismo de maturação. Entre elas, as proteínas do complexo MPF (fator promotor da maturação) e proteínas da família MAPK (proteína cinase ativada por mitógenos) (SHENG et al. 2002; SIRARD et al. 1998), e enzimas reguladoras dos níveis de AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) e GMPc (guanosina monofosfato cíclico), tais como fosfodiesterases (PDE's) e adenilato ciclase (AC) e guanilato ciclase (GC) (LAFOREST et al. 2005).

O MPF é um heterodímero formado por uma subunidade de ciclina B regulatória e uma cinase catalítica (p34^{cdc2} ou CDK1) (ABRIEU et al. 2001; JONES et al. 2004). Ele é um dos responsáveis pelas modificações morfológicas 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, o MPF mantém-se em baixa atividade. Quando ocorre a retomada da meiose, o MPF torna-se ativo, apresentando máxima atividade em MI. Depois, sofre um declínio transitório entre MI e MII e, nesta última fase, mantém-se em máxima atividade (MOTLIK et al. 1998). A sua inativação na fase de MII ocorre quando há a fecundação ou a ativação partenogenética do oócito e é necessária para que ocorra o desbloqueio da meiose e sua finalização e o início dos processos do desenvolvimento embrionário (TAIEB et al. 1997). As proteínas pertencentes ao grupo da MAPK pertencem à família das serina/treonina cinases. A ampla faixa de atuação das MAPKs é medida pela fosforilação de diversos substratos que incluem fosfolipases, fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto. A ativação da MAPK em oócitos bovinos ocorre após 8 horas de cultivo in vitro e apresenta um aumento gradual até 12-14 horas, se mantendo estável até o final da maturação (KUBELKA et al. 2000).

A MAPK possui duas principais isoformas, a ERK1 e a ERK2. Em oócitos bovinos estas duas isoformas são ativadas com a proximidade do rompimento da VG. Isto sugere que a MAPK não é requerida para o reinício da meiose, mas é essencial para eventos depois do rompimento da VG (KANO et al. 2000; LEFEBVRE

et al. 2002) e também pode induzir a expressão de NOS e a produção de NO (TAO et al. 2005).

2.2. Hormônio Folículo Estimulante

Em várias espécies, a adição de FSH ao meio de cultivo para maturação *in vitro* (MIV) vem sendo utilizada apresentando resultados positivos para a indução da maturação (FU et al. 2007, ZHANG et al. 2007; Rodriguez et al. 2002; Rodriguez e Farin 2004) e o aumento e melhora no processo de maturação oocitária (IZADYAR et al. 1998; Calders et al. 2003).

O FSH ao associar-se ao seu receptor nas células da granulosa, inicialmente eleva os níveis de AMPc nessas células, ativando a proteína cinase dependente de AMPc (PKA) dos tipos I e II. A ativação da PKA tipo I mantém, num primeiro momento, o oócito em estágio de vesícula germinativa (VG), mas a ativação da PKA tipo II estimula um evento transcricional, que resulta mais tarde na queda dos níveis de AMPc e na quebra da vesícula germinativa (VG), sinalizando a retomada da meiose. A retomada da meiose estimulada pelo FSH é dependente de uma queda no processo de transcrição em células do *cumulus* (RODRIGUEZ e FARIN, 2004) e da ativação da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) nas células do *cumulus* (FISSORE et al. 1996; SU et al. 2001) e no oócito (SU et al. 2001).

2.3. Sistema NOS/NO

O NO é uma molécula gasosa simples com uma meia vida em meio aquoso de menos de 10 segundos. Esse mensageiro químico é formado a partir da transformação da L-arginina em L-citrulina + NO na presença de NADPH e O₂ (THALER e EPEL, 2003).

O NO é produzido pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que pode ser encontrada em três isoformas distintas. A isoforma neuronal (NOS1), a induzível (NOS2) e a endotelial (NOS3). As NOS1 e 3 são isoformas constitutivas com atuação dependente de cálcio e calmodulina e geram NO normalmente em baixa concentração 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 (FLORA FILHO e ZILBERSTEIN, 2000).

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 produzi-lo (HATTORI et al. 2000, 2004). Em ratas a NOS3 foi detectada no ovário, oviduto, útero, cerviz e vagina e sua expressão variou com as fases do ciclo estral (CHATTERJEE et al. 1996).

O sistema NOS/NO tem sido relacionado a várias funções reprodutivas como desenvolvimento folicular (MITCHELL et al. 2004), expressão de receptores de LH nas células da granulosa (NISHIDA et al. 2000) e maturação de oócitos (JABLONKA-SHARIFF e OLSON, 1998; JABLONKA-SHARIFF e OLSON, 2000), entre outras (SENGOKU et al. 2001; TRANGUCH et al. 2003).

Alguns estudos sugerem que o NO deva ter função em oócitos. A enzima responsável pela sua produção foi detectada em oócitos de roedores (JABLONKA-SHARIFF e OLSON, 1997) e suínos (HATTORI et al. 2000; HATTORI et al. 2001; TAKESUE et al. 2003). A produção de NO por oócitos (indicando atividade da NOS) também foi observada (TAKESUE et al. 1999). A atividade da NOS tem sido relacionada à maturação (SENGOKU et al. 2001; NAKAMURA et al. 2002; CHMELIKOVÁ et al. 2004) e à ativação do oócito (KUO et al. 2000; SEDMIKOVÁ et al. 2004).

Em bovinos há poucos dados a respeito do papel do sistema NOS/NO nos diversos aspectos da atividade reprodutiva dessa espécie. Basini et al (1998) e Basini e Tamanini (2000) sugerem que o NO tenha importante papel na modulação da função das células da granulosa. Reyes et al (2004) detectaram a atividade de NOS em oócitos imaturos e espermatozóides bovinos e Viana et al (2004) observaram que a adição de um doador de NO no meio de maturação causa um retardo na progressão da meiose.

Estudos em nosso laboratório revelaram que a enzima NOS3 não só está presente no tecido ovariano bovino como também no citoplasma de oócitos imaturos e maturados *in vitro* (NATORI et al. 2005). Essa observação foi confirmada e estendida pela detecção de RNAm para NOS2 e NOS3 e também da proteína da NOS3 nos oócitos bovinos (ADONA et al. 2007; PIRES et al. 2009), corroborando com as observações de Tesfaye et al (2006), que também observaram expressão de RNAm para NOS2 e NOS3 em oócitos e embriões bovinos. Estudos desenvolvidos em nosso laboratório por Schwarz et al (2007) e Schwarz et al (2008) mostraram ainda, que a inibição da atividade da NOS e que também o aumento da

disponibilidade de NO durante a MIV de oócitos bovinos, reduziu as taxas de maturação e aumentou o grau de apoptose nos embriões produzidos *in vitro*. Um estudo recente de Bilodeau-Goeseels (2007) demonstrou que a inibição da NOS2 no início do cultivo de MIV reduziu a taxa de rompimento da vesícula germinativa, ou seja, de retomada da meiose, enquanto que a adição de um doador de NO estimulou. Esses estudos trazem evidências de que também em bovinos o sistema NOS/NO tenha papel relevante na maturação oocitária.

O FSH também é capaz de influenciar o sistema NOS/NO. Hattori et al. (2000) observaram que o FSH é capaz de suprimir a síntese de NO em oócitos suíno, embora a quantidade de proteínas para NOS3 tenha se mantido constante durante a maturação. A expressão de RNAm para o receptor de LH induzida por FSH em células da granulosa de suínos é precedida por um aumento na expressão de NOS3 (TAKESUE et al. 2001). Em oócitos bovinos, Pires et al. (2009) mostraram também que a expressão da NOS2 e NOS3 são alteradas durante a maturação, com a utilização de meio de maturação em que foram suplementados também com FSH. Estes relatos sugerem a mediação de NO em algumas das funções do FSH.

2.4. AMPc e GMPc

O AMPc e o GMPc são nucleotídeos cíclicos sinalizadores intracelulares que exercem importantes papéis no controle de fosforilação de proteínas específicas. Seus níveis são controlados basicamente por um conjunto enzimas anabolizadoras e catalizadoras. As enzimas adenilase ciclase (AC) e guanilase ciclase (GC) são responsáveis pela produção destes nucleotídeos, e as fosfodiesterases (PDE), pela degradação dos mesmos. As PDE apresentam-se em várias isoformas, tendo sido a PDE3 identificada em oócitos e a PDE4 nas células da granulosa (TSAFIRI et al. 1996; LIANG et al. 2005). As células de granulosa parecem também expressar a PDE3 (BILODEAU-GOESEELS, 2003). As PDE do tipo 5 e 6 também foram identificadas em oócitos e em células do *cumulus* suínas (SASSEVILLE et al. 2008).

As duas vias de ação mais comuns conhecidas na esfera reprodutiva, especificamente no processo de maturação de oócitos, é a ativação das proteínas cinases dependentes de AMPc e GMPc (PKA e PKG, respectivamente) (CHEN et al. 2006). Estas irão exercer papel fundamental em diversas funções celulares, inclusive na maturação oocitária (LAFORREST et al. 2005). Evers et al (2005)

verificaram que o AMPc atua diretamente no controle dos níveis de MPF, tendo assim papel fundamental na manutenção da meiose até o momento da maturação e a sua redução resulta na retomada da meiose (CHEN et al. 2006; CHEN E DOWNS, 2008). Já o GMPc, parece ter atuação diretamente na degradação de algumas fosfodiesterases (PDE), entre elas a do tipo 3, fundamental no controle dos níveis de AMPc (DENNINGER E MARLETTA, 1999).

A queda dos níveis de AMPc no oócito ocorre mediada pelo aumento da atividade da PDE3A, que se dá tanto na retomada da meiose espontânea, como na induzida por gonadotrofinas (RICHARD et al. 2001), leva à retomada da maturação com a ativação do MPF (GOREN e DEKEL, 1994; DUCKWORTH et al. 2002)

Tendo em vista que o GMPc exerce certa atividade sobre algumas PDE, e estas são responsáveis pela degradação do AMPc, vários estudos têm sugerido e evidenciado que o GMPc é capaz de interferir nos níveis de AMPc. As PDEs juntamente com a enzima AC, cuja atividade resulta na produção desse nucleotídeo, controlam os níveis intracelulares do AMPc, estando essas enzimas envolvidas no controle da meiose de oócitos (LAFOREST et al. 2005).

O NO utiliza, dentre outras, a via do GMPc para exercer suas funções (ZHANG et al. 2009). Além disso, o NO é capaz de atuar sobre a PDE4 (WANG e SHI, 2007), enquanto a PDE3 é especificamente inibida pelo GMPc (LUGNIER et al. 1999). Tal fato sugere que o GMPc possa, dessa forma, participar no controle dos níveis de AMPc do oócito e/ou células da granulosa. Parece que a regulação diferencial de cada isoforma de PDE em diferentes compartimentos do complexo *cumulus*-oócito estaria envolvida no controle dos níveis de AMPc e na maturação (LIANG et al. 2005). Em bovinos, inibidores específicos de PDE3 resultam no bloqueio da meiose (MAYES E SIRARD, 2002), enquanto que de PDE4 não têm efeito. Sirotkin et al (2000) observaram que a via do GMPc e da PKG estaria envolvida no controle de uma série de funções das células da granulosa de suínos, incluindo a produção de AMPc e PKA. A PDE5, por sua vez, é ativada pelo GMPc e é responsável pela degradação do próprio GMPc (DENNINGER e MARLETTA, 1999).

Desta forma, tendo em vista todos os aspectos citados acima, é sugerida uma intrincada inter-relação das gonadotropinas, AMPc/PKA, GMPc/PKG, NOS/NO e MAPK (ZHANG et al. 2007).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi de averiguar a influência do FSH e a possível mediação das células de granulosa, sobre a via do sistema NOS/NO e seus componentes, na maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

Como objetivos específicos, propusemos avaliar o efeito do FSH em oócitos maturados *in vitro* com e sem células da granulosa sobre: 1) maturação nuclear; 2) produção de NO; 3) níveis de GMPc; 4) níveis de AMPc; 5) abundância relativa de RNAm das vias do NO, do GMPc e do AMPc .

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local do experimento

O experimento foi desenvolvido no 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. Reagentes e meios

Exceto quando mencionado, reagentes e meios foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

4.3. Obtenção dos oócitos

Ovários bovinos foram coletados em frigorífico logo após o abate e transportados em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) acrescida de antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 UI/mL de estreptomicina). à temperatura de 35° C. No laboratório, os ovários foram lavados com a mesma solução e os folículos com diâmetro de 2 - 6 mm foram aspirados com auxílio de uma agulha 18 “G” acopladas a seringas estéreis e descartáveis de 10 mL. O líquido folicular recuperado foi depositado em tubos cônicos de 50 mL e mantido em repouso por 5 minutos para decantação. A porção superior foi retirada e o precipitado foi transferido para placas de Petri (60 mm, Corning®, NY, USA) onde se realizou a busca dos oócitos sob microscópio estereoscópico (Nikon Co., Thailand). Foram utilizados no experimento oócitos considerados como grau I (GI), contendo mais de 3 camadas de células do cumulus compactas e citoplasma homogêneo e oócitos grau II (GII), contendo de 2 a 3 camadas de células do cumulus compactas e citoplasma homogêneo.

4.4. Maturação *in vitro*

Para a maturação *in vitro* (MIV), os oócitos foram cultivados com as suas células do *cumulus* intactas (complexos *cumulus*-oócitos – CCO) ou após serem desnudados (oócitos desnudos – OD), para determinar a mediação dessas células

nos efeitos observados nas avaliações a serem feitas. As duas categorias de oócitos (CCO e OD) foram incubadas em gotas de 100 µl (20-30 estruturas por gota) de meio de maturação (MM) sob óleo mineral. O MM foi constituído de TCM-199 acrescido de 0,1% de PVA (álcool polivinílico), piruvato de sódio (0,25 mM) e gentamicina (0,01mg/ml). Ao meio de maturação foi ainda adicionado ou não o FSH (0,05UI/ml, Gonaf-f®, Serono, Bari/Itália) para determinar sua influência nos parâmetros estudados. Dessa forma foram constituídos 4 grupos de cultivo: CCO maturados com FSH; CCO maturados sem FSH; OD maturados com FSH e OD maturados sem FSH. O cultivo foi feito por 24 horas em estufa a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ar. Ao final da MIV os oócitos foram submetidos às diferentes avaliações. O desnudamento para obter os OD foi feito por agitação no *vortex* (5 minutos, Phoenix/Araraquara, Brasil) em tubo de 5 ml com 0,3 ml de PBS livre de cálcio e magnésio com 0,1% de PVA.

4.5. Determinação da taxa de maturação

A determinação da taxa de maturação foi feita a partir da coloração por Orceína Acética 1%. Após a MIV, os grupos experimentais foram primeiramente desnudados para permitir a visualização da cromatina. A seguir, os oócitos foram fixados entre lâmina e lamínula por 24 horas em etanol: ácido acético (3:1) e depois corados com orceína acética 1%. Os oócitos foram então observados em microscópio de contraste de fase (Zeiss, Germany) para determinação da proporção de oócitos que atingem o estágio de metáfase II (MII). Oócitos em metáfase II foram considerados maturados.

4.6. Determinação da produção de NO pelo método de Griess

Para determinação dos níveis de NO produzidos foi utilizada a avaliação indireta pelo método de Griess para quantificação de nitrato. As análises foram feitas utilizando-se o kit Griess Reagent System (Gibco®, Madison – WI, EUA). Nesse método 100µL do meio de cultivo foi armazenado logo após a MIV à -20°C. Os meios armazenados de todos os grupos experimentais foram submetidos a uma reação química envolvendo uma solução de reação (Sulfanilamida 1% em H₃PO₄ 5% e α-naftil 0.1%, numa proporção de 1:1). Para a reação 100µL desta solução de

reação foi adicionado em 100µL do meio de cultivo e aguardado 10 min. em ambiente protegido da luz. A leitura da absorbância foi feita à 546nm. Para determinação das concentrações de nitrito das amostras, uma curva padrão foi feita juntamente aos experimentos para que a mesma pudesse ser calculada por uma equação da curva.

4.7. Determinação dos níveis de AMPc e GMPc

A mensuração dos níveis intracelulares de AMPc e de GMPc foi realizada pelo método de imunensaio enzimático (EIA) de acordo com as instruções dos respectivos kits (Direct Cyclic GMP e AMP EIA, Enzo® Life Sciences, Ann Arbor, MI, EUA). Resumidamente, os CCO foram removidos do cultivo e rapidamente lavados em TCM-199 com 20mM Hepes e 0,4% BSA e transferidos para 200µl de 0,1N HCl. Os CCOs foram lisados por 20 min e centrifugados em *vortex* a 12.000g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e armazenado a -20°C até ser submetido aos imunoenaios. Para os imunoenaios, as amostras foram incubadas com o anticorpo primário IgG (localizado nos poços), juntamente com uma solução contendo fosfatase alcalina e uma terceira solução contendo o anticorpo secundário policlonal de coelho específico para AMPc. Após duas horas de incubação os poços foram lavados com PBS e tratados com duas soluções, pNpp e *stop solution*, a primeira com função de reagir com o substrato que se encontra nos poços e provocar uma alteração na coloração (amarelada), e a segunda tem a função de parar esta reação. Em seguida as absorbâncias das amostras foram lidas à 405nm por espectrofotometria. Para determinação das concentrações do nucleotídeos uma curva padrão foi feita juntamente ao experimento para que a mesma pudesse ser calculada por uma equação da curva.

4.8. Reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT PCR)

Para coleta das amostras (*pools* de 20 oócitos e suas respectivas células do cumulus), os CCO foram primeiramente desnudados manualmente com auxílio da pipeta de mão e as células do *cumulus* dos grupos CCO foram coletadas em microtubos e centrifugadas por 5 min a 300 g. O sobrenadante foi descartado e às amostras foram adicionados 3µL com 1U/µL de inibidor de RNase (Invitrogen,

Carlsbad, CA, EUA). Em seguida, as amostras foram mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C . Os oócitos (CCO desnudados ou OD) foram lavados três vezes em PBS + 0,1% de PVA com $1\text{U}/\mu\text{L}$ de inibidor de RNase, transferidos para microtubos com $1\ \mu\text{l}$ dessa solução, mergulhados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C . As amostras foram depois submetidas à extração de RNA com o RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído foi submetido à transcrição reversa utilizando a enzima Improm-II Reverse Transcriptase (Promega Madison, WI, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. Nas amostras de RNA foi adicionado o tampão da reação (5X), MgCl_2 (25 mM), oligo(dT) (0,5 μg), dNTPs (10 mM), inibidor de RNase (40 UI) e a enzima (200 UI). A reação de cDNA foi realizada em termociclador (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) por 60 min a 42°C , seguido de aquecimento a 70°C por 15 min e posterior resfriamento a 4°C para congelamento a -20°C . Como controles da reação foram incluídos *primers* para o gene peptidylprolyl isomerase A (PPIA; TATSUMI et al. 2008).

As amplificações foram realizadas em termociclador para PCR em tempo real (Applied Biosystems, 7500 Real Time PCR System). Nas reações para quantificação relativa dos genes selecionados (NOS2, PKA1A, PKG1, PKG2, ADCY6, ADCY9, PDE3A, PDE5A, PDE6, Tabela IV.1) e o controle endógeno (PPIA), foi utilizado o SYBR® PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e $0,2\ \mu\text{M}$ de cada oligonucleotídeo iniciador em reação de $20\ \mu\text{L}$. 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 cada gene e controle endógeno para todas as reações.

4.8.1. Análise dos dados da PCR

Para validação dos genes 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 ($E=10^{((-1/\text{SLOPE})-1)}$) em cada gene estudado (Figura IV.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 estariam validados quanto à sua eficiência de reação.

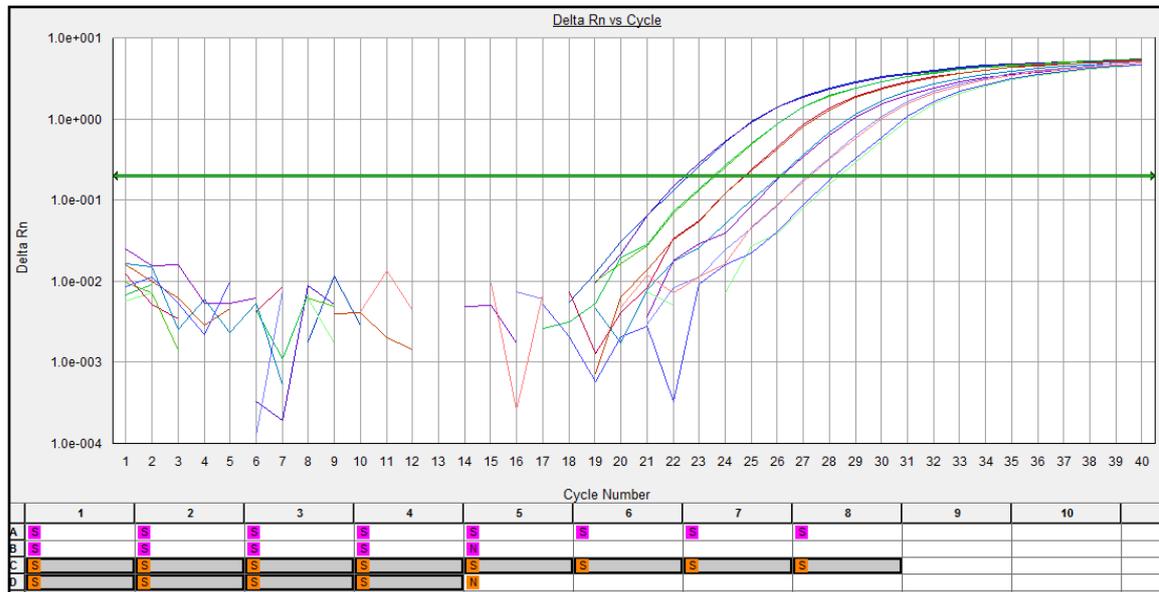


Figura IV.1. Curva padrão de amplificação para o gene PPIA, por PCR em tempo real para oócitos maturados em diluições 1:1.

Tabela IV.1. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação relativa dos genes selecionados.

| Gene | Seqüência (5´- 3´) | GenBank | Tamanho do Fragmento (PB) |
|---------------|---|-----------------|---------------------------|
| PPIA | 5´ CCACCGTGTTCCTTCGACATC 3´ 5´ ATCCTTTCTCTCCAGTGCTCAG 3´ | NM_178320. 2 | 126 |
| iNOS | 5´ AGGTGCACACCGCCTATT 3´ 5´ CCGCAGGATGTCTTGAACA 3´ | NM_001076799. 1 | 65 |
| PRKAR1 | 5´ CTGCTCAAGGACTCCATCGT 3´ 5´ AGGTTCTGGATCTGCTTTGC 3´ | NM_001076358. 1 | 116 |
| PRKG1 | 5´ GGGACCTCAAGCCTGAAAAT 3´ 5´ GCAAAGCCAAAATCAACCAG 3´ | NM_174436. 2 | 70 |
| PRKG2 | 5´ AAGCAGCAGGAGCATGTCTA 3´ 5´ TTGTCCTTGAAGGTGCGATA 3´ | XM_612707. 3 | 92 |
| ADCY6 | 5´ GACTTGTGCCGTGTACTCCTG 3´ 5´ CCAACTGCGGTGCTATGTG 3´ | NM_001143877. 1 | 99 |
| ADCY9 | 5´ TCCTGGTATTCGCCCTGAC 3´ 5´ AGCCCGAGTATGATTGAAGTTGT 3´ | XM_603835. 3 | 89 |
| PDE3A | 5´ ATCACCCGGGAAGGACTAAT 3´ 5´ CGCATGATGATTCTCCAAGA 3´ | XM_616776. 4 | 95 |
| PDE5A | 5´ TGATCAGTGCCTGATGATCC 3´ 5´ AATGGAGAGGCCACTGAGAA 3´ | NM_174417. 2 | 61 |
| PDE6C | 5´ TTCACGGCTCTTCCATCTTG 3´ 5´ CCAGGTCAGTCGCTATTATCG 3´ | NM_174419. 1 | 153 |

4.9. Delineamento Experimental

Para os experimentos realizados foram utilizados oócitos maturados com suas células do cumulus (CCO) ou sem as mesmas (OD) para investigar a mediação dessas células nos efeitos observados. Os diferentes grupos foram então maturados com ou sem FSH para determinar a influência dessa gonadotrofina nos parâmetros avaliados. Os experimentos realizados estão descritos a seguir. Um esquema resumido encontra-se na figura IV.2.

Experimento 1: Efeito de diferentes concentrações de FSH na taxa de maturação nuclear *in vitro* CCO e OD.

Para este experimento foram determinadas as taxas de maturação (% de metáfase II) de CCO e OD submetidos à 24 horas de MIV na presença de diferentes concentrações de FSH (0, 0,005, 0,05 0,5 e 5 UI/mL). Os experimentos para CCO e OD foram independentes. Nesse experimento foi determinada a concentração mais adequada de FSH para os seguintes.

Experimento 2: Influência do FSH e das células do *cumulus* na produção de NO.

Para essa avaliação, a MIV foi desenvolvida em gotas de 100µL do meio de maturação em poços de placas de 96 poços, os poços não utilizados foram completados com água destilada estéril para evitar evaporação durante a MIV. A não utilização de óleo mineral neste experimento foi adotada já que o mesmo interfere nas leituras por espectrofotometria.

Os oócitos dos grupos CCO e OD foram submetidos à 24 horas de maturação na presença ou ausência do FSH (0,05 UI/mL). Ao final da MIV, os meios de cultivo foram coletados e armazenados à -20°C. Em seguida foram mensurados em relação aos níveis de nitrato pelo método de Griess. Paralelamente, os oócitos cultivados foram também avaliados quanto à sua taxa de maturação nuclear por coloração da cromatina por orceína acética 1% durante 5 min.

Experimento 3: Influência do FSH nos níveis dos nucleotídeos AMPc e GMPc .

Os oócitos dos grupos CCO foram submetidos ao cultivo de maturação *in vitro* na presença ou não do FSH (0,05 UI/mL). Em seguida, os mesmos foram submetidos como CCO (sem desnudamento das células do cumulus) à mensuração intracelular de GMPc e AMPc em experimentos independentes. As avaliações foram realizadas às 0, 1, 3 e 6 horas de MIV para determinar o efeito do FSH nos níveis dos nucleotídeos cíclicos no início da maturação. A mensuração dos níveis intracelulares de AMPc e GMPc foi realizada pelo método de imunoenensaio enzimático (EIA), com *pools* de 30 e 10 CCO, respectivamente, tomando-se o cuidado para que o tamanho do revestimento de células do *cumulus* em torno dos oócitos fosse de tamanhos similares (BILODEAU-GOESEELS, 2007). Também foi utilizado o mesmo método de maturação em placas de 96 poços do experimento de mensuração de NO. As mensurações foram feitas em 2 experimentos independentes, um para mensuração de AMPc e outro para GMPc. Após 0, 1,3 e 6 horas de cultivo de maturação dos CCOs incubados com e sem FSH, os mesmo foram retirados do cultivo para avaliação.

Experimento 4: Influência do FSH e células do *cumulus* na expressão de genes das vias do NO, GMPc e AMPc.

Os oócitos dos grupos CCO e OD foram submetidos à 24 horas de maturação na presença ou não do FSH (0,05 UI/mL). Os oócitos e as células do cumulus dos CCO e os oócitos OD foram avaliados quanto à expressão relativa dos genes da via NOS/NO (NOS2), GMPc (PDE5A, PDE6C, PKG1 e PKG2) e AMPc (ADCY6, ADCY9, PDE3A,PKA1).

4.10. Análise estatística

Todos os experimentos 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, determinação de NO e quantificação relativa dos genes alvos de “Bonferroni” para o experimento de determinação dos níveis de AMPc e GMPc. Todos os experimentos foram repetidos de 3 a 5 vezes.

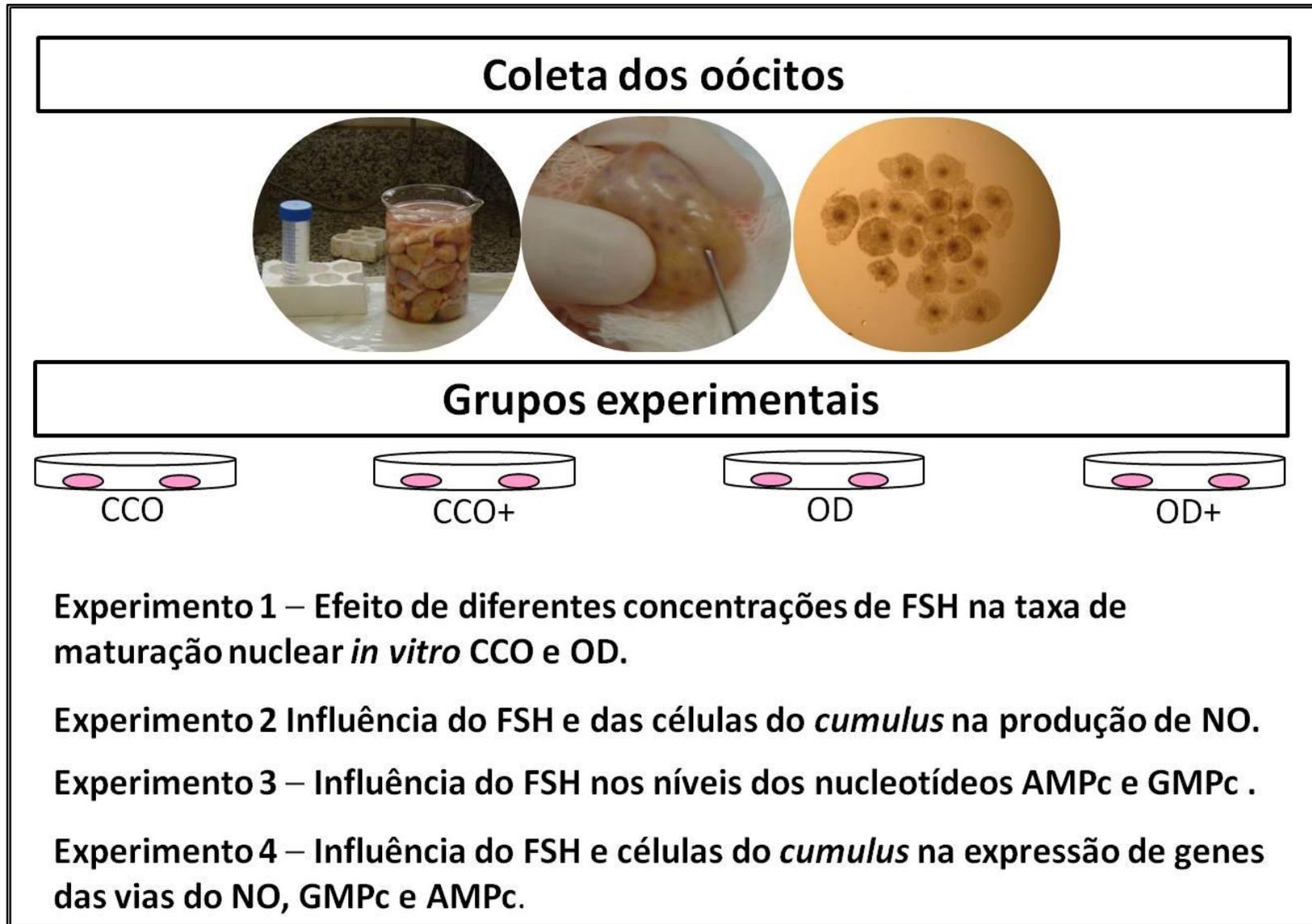


Figura IV.2: Modelo esquemático do delineamento experimental.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Experimento 1: Efeito de diferentes concentrações de FSH na taxa de maturação nuclear *in vitro* CCO e OD.

O presente experimento teve como objetivo determinar qual a melhor concentração de FSH para estimular a maturação de CCO e OD para utilização nos experimentos seguintes.

Na avaliação da maturação (Tabela V.1. e Figura V.1), o grupo CCO apresentou taxa de maturação baixa na ausência de FSH (14%, $P < 0,05$) e um aumento na mesma quando o FSH (0,005 a 5 UI/mL) foi incluído no cultivo (56 a 81%), sendo a melhor taxa de maturação obtida na presença de 0,05 UI/mL de FSH (81%, $p < 0,05$).

Para OD a melhor taxa de maturação também foi obtida na concentração de 0,05 UI/mL de FSH (89%). Na ausência de FSH a taxa de maturação foi de 63% e foi similar às taxas de maturação das demais concentrações que variaram de 65 a 74% ($P > 0,05$). Esses resultados confirmam observações anteriores de que o FSH individualmente é capaz de induzir a maturação nuclear (FU et al. 2007, ZHANG et al. 2007). Como a concentração de 0,05 UI/mL de FSH resultou em melhores taxas de maturação para CCO e OD, esta foi então utilizada para os experimentos seguintes.

Tabela V.1. Taxas de maturação nuclear de oócitos submetidos a maturação *in vitro* por 24 h com diferentes concentrações de FSH e na presença (CCO) ou ausência (OD) de suas células do cumulus durante o cultivo.

| Tratamentos FSH(UI/mL) | CCO | | OD | |
|---------------------------|-----|--------------------|-----|--------------------|
| | N | % | N | % |
| Controle | 98 | 14,3 ^d | 100 | 63,0 ^b |
| FSH 0,005 | 100 | 62,0 ^{bc} | 99 | 64,6 ^b |
| FSH 0,05 | 98 | 80,6 ^a | 100 | 89,0 ^a |
| FSH 0,5 | 100 | 74,0 ^{ab} | 93 | 74,4 ^{ab} |
| FSH 5 | 99 | 56,4 ^c | 94 | 72,4 ^{ab} |

CCO = complexos cumulus-oócitos; OD = oócitos desnudos. As taxas de maturação referem-se aos oócitos que atingiram o estágio de metáfase II. Os experimentos para os grupos CCO e OD foram

independentes. ^{a-d} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa a 5%. Resultados de 4 repetições.

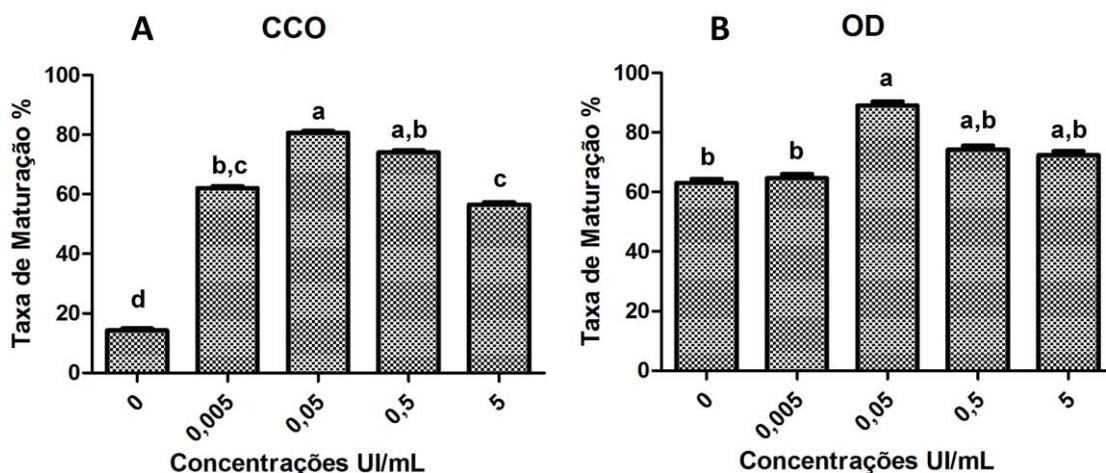


Figura V.1. Taxa de maturação referentes aos tratamentos e concentrações dos grupos CCO (A) e OD (B).

Embora seja sabido que o FSH é capaz de estimular a maturação nuclear, as taxas de maturação relativamente elevadas em OD (63 a 89%) foram inesperadas, visto que RNAm para receptores de FSH não foram detectados em oócitos bovinos, mas apenas nas células da granulosa (CALDER et al. 2005; NUTTINCK et al. 2004). Sendo assim, a ação do FSH sobre o oócito teria que se dar via células do *cumulus* e não deveria ser observada em oócitos desnudos.

Entretanto, outros estudos em suínos, humanos e camundongos, foram relatados a detecção do receptor para FSH em oócitos (MÉDURI et al. 2002; PATSOULA et al. 2001, 2003), tanto o RNAm como a proteína. É possível que os estudos em bovinos tenham falhado em detectar o receptor ou que de fato haja uma diferença entre as espécies. Fatores oriundos do BSA e/ou SFB nos meios de cultivo dos trabalhos também podem ter certa influência sobre os resultados e esses fatores estão ausentes no nosso experimento.

No entanto, mesmo na ausência de FSH, uma parte considerável dos oócitos desnudos maturou. A taxa de maturação observada, embora menor que aquela observada na presença de FSH, foi relativamente alta (por exemplo, em CCO sem FSH a taxa de maturação foi de apenas 14%) e semelhante ao cultivo na presença das outras concentrações de FSH. Essa

observação sugere que a progressão da maturação nuclear tenha ocorrido mais pela ausência das células do *cumulus*, que participam do controle do bloqueio meiótico do oócito (AKTAS et al. 2003), do que por um efeito estimulatório da presença do FSH. De todo modo, uma das concentrações utilizadas resultou num aumento significativo da maturação.

Desta forma, outro experimento foi desenvolvido para comparar diretamente o efeito do FSH na taxa de maturação, bem como na produção de NO em CCO e OD.

5.2. Experimento 2: Influência do FSH e das células do *cumulus* na produção de NO.

Neste experimento, além da mensuração da produção de NO via detecção de nitrito no meio de maturação dos oócitos cultivados, também foram avaliados os oócitos quanto à taxa de maturação para averiguar a influência do FSH na síntese de NO, além da maturação. Os grupos CCO e OD foram maturados com ou sem 0,05 UI/mL de FSH e as avaliações feitas ao final da MIV. Para as taxas de maturação, foram observadas as porcentagens de 48,5; 63,2; 71,3 e 74,7%, para CCO e OD sem e com FSH, respectivamente, não havendo diferença entre os grupos ($p > 0.05$, tabela V.2. Porém, o valor de “p” foi igual à 0.07, sugerindo uma tendência de aumento para taxa de maturação nos grupos suplementados com FSH.

Embora a diferença observada no primeiro experimento (aumento de taxa de maturação pela presença de FSH) não tenha mais sido detectada (apenas tendência), de toda forma ficou confirmada a capacidade dos OD de entrar em maturação, na presença ou ausência de FSH.

Essa observação reforça a plausibilidade de nossa hipótese de que, a ausência das células do *cumulus* e não a presença do FSH seja responsável pela retomada da meiose nesses oócitos, especialmente considerando-se que receptores de FSH não foram, até o momento, detectados em oócitos bovinos (CALDER et al. 2005; NUTTNICK et al. 2004). De toda forma, as taxas de maturação foram, em geral, mais baixas para todos os grupos em comparação com o primeiro experimento, o que talvez tenha prejudicado a observação mais clara do efeito do FSH na maturação de CCO e DO. Essa queda nas taxas de

maturação pode ter sido ocasionada pela época do ano em que os oócitos foram coletados. Sabe-se que no período da seca a qualidade dos oócitos é reduzida, prejudicando a maturação dos mesmos (Zeron et al. 2001) e esses experimentos foram realizados entre os meses de julho e setembro, coincidentes com o período de seca no sudeste do País.

Tabela V.2. Taxas de maturação nuclear de oócitos submetidos à maturação *in vitro* por 24 h na presença (CCO) ou ausência (OD) de suas células do *cumulus* durante o cultivo, suplementado com 0,05UI/mL de FSH.

| Tratamentos FSH(UI/mL) | CCO | | OD | |
|---------------------------|-----|------|----|------|
| | N | % | N | % |
| Controle | 75 | 29,3 | 73 | 61,6 |
| FSH 0,05 | 68 | 71,0 | 59 | 71,3 |

CCO = complexos cumulus-oócitos; OD = oócitos desnudos. As taxas de maturação referem-se aos oócitos que atingiram o estágio de metáfase II. Resultados de 4 repetições.

Em relação à produção de NO foram observados os valores de 12,8 e 11,7 $\mu\text{M/mL}$, respectivamente, para os grupos CCO suplementado ou não com FSH e 7,4 e 8,6 $\mu\text{M/mL}$ para os grupos OD com e sem FSH, respectivamente (Figura V.2). Apesar dos níveis de NO não apresentarem diferenças entre os grupos ($p > 0,05$) e serem similares aos relatados por Matta et al (2009), os grupos cultivados com células do *cumulus* apresentaram níveis mais elevados de NO. Tendo em vista que células do *cumulus* também produzem NO (Han et al. 2006), conseqüentemente os CCO apresentam maiores níveis de NO em relação aos OD. De toda forma, tanto em CCO como em OD não houve efeito do FSH na produção de NO.

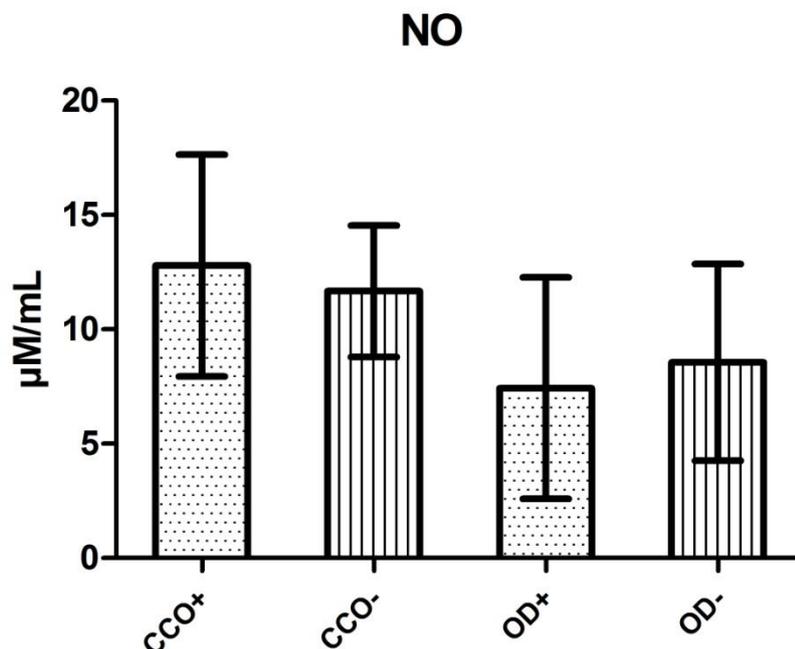


Figura V.2. Níveis de nitrito ($\mu\text{M}/\text{mL}$) produzidos por CCO e OD maturados na presença (+) ou na ausência (-) de FSH. Não houve diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$). Resultados de 4 repetições.

Hattori et al (2000), porém, relataram que o FSH é capaz de inibir a produção de NO em oócitos de suínos. Essa contradição pode ser resultado de diferenças entre espécies ou nas condições experimentais. Hattori et al (2000) usaram oócitos suínos oriundos de folículos pequenos cultivados em meio com BSA e FSH por 72 h. No presente estudo, foram utilizados oócitos bovinos oriundos de folículos medianos cultivados por 24 h em meio sem fonte protéica e com FSH. No entanto, não se pode descartar que o FSH seja capaz de interferir na síntese de NO, mas é possível que esse efeito somente ocorra após um tempo maior de cultivo ou em oócitos sabidamente menos competentes para o desenvolvimento, como aqueles oriundos de folículos pequenos (LONERGAN et al. 1994).

5.3.Experimento 3: Influência do FSH nos níveis dos nucleotídeos GMPc e AMPc .

Em relação aos níveis dos nucleotídeos cíclicos (Figura V.3.) observou-se que no início da maturação (0h) o nível de GMPc apresentou valor de 185,5pmol/pool. Após 1h de maturação elevaram-se para 266,4 e 240,5 pmol/pool na presença ou ausência do FSH, apresentando aumento dos níveis na presença do FSH ($P<0,05$). Após 3 h de maturação, os níveis de GMPc declinaram a níveis similares aos do início da maturação (187,2 e 168,5 pmol/pool), porém, desta vez, ainda com níveis mais elevados na presença do FSH apresentando diferença entre o tratamentos ($p<0,05$). Com 6 horas de maturação os níveis declinaram-se apresentando 46,3 e 106,9 pmol/pool respectivamente para presença e ausência do FSH, só que neste momento, a presença do FSH resultou numa queda mais acentuada nos níveis do GMPc. ($p<0,05$).

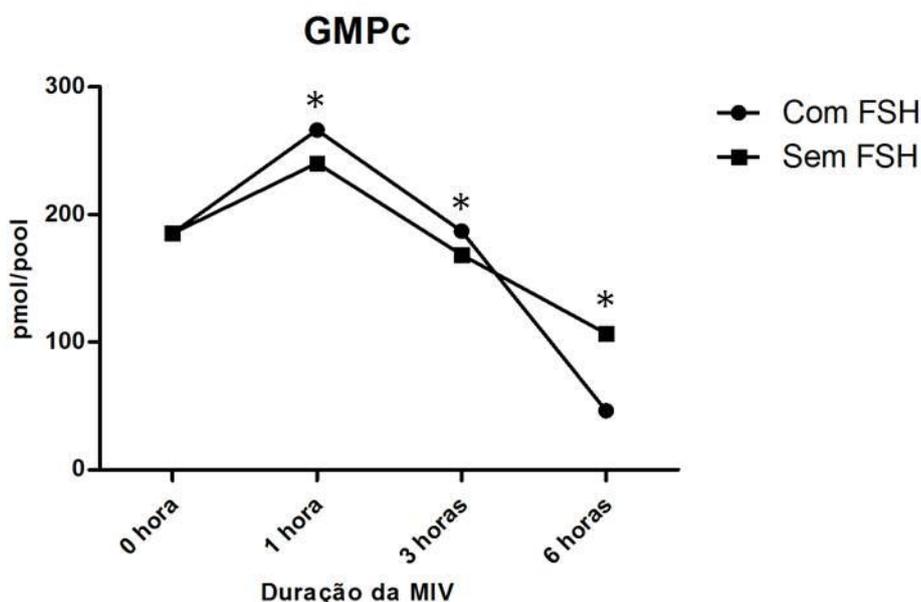


Figura V.3. Níveis de GMPc produzidos por CCO maturados na presença ou na ausência de FSH às 0, 1, 3 e 6 h de MIV. * indica diferença significativa ($P<0,05$) entre os tratamentos dentro de um mesmo horário.

Desta forma ficou caracterizado um aumento nos níveis GMPc durante a primeira hora de maturação, seguido de um decréscimo contínuo até as 6

horas de MIV. Tal fato corrobora com dados encontrados por Norris et al (2009), que descreveram altos níveis de GMPc na primeira hora de maturação seguido de uma diminuição gradativa em oócitos de camundongos.

Níveis elevados de GMPc podem inibir a PDE3 (no oócito) contribuindo para o bloqueio meiótico e esta inibição da PDE3 ocorre devido à comunicação das células dos *cumulus* com o oócito pelas junções *gap*, permitindo a passagem do GMPc de uma célula a outra (SELA-ABRAMOVICH et al. 2006; NORRIS et al. 2008). Quando há depois a queda nos níveis de GMPc, o efeito inibitório sobre a PDE3 do oócito provavelmente cessa, permitindo a retomada da meiose.

Já foi relatado em ratos que a queda nos níveis de GMPc coincide com a retomada da meiose (TORNELL et al. 1990). Não há informações sobre o comportamento do GMPc no início da maturação de oócitos bovinos, mas nossos resultados mostram que é similar ao relatado em outras espécies. Os resultados indicam que o FSH inicialmente estimula um aumento nos níveis de GMPc, mas que esse efeito já é perdido com 6 h de MIV. Não há estudos sobre o efeito do FSH nos níveis de GMPc. Há somente um estudo em hamsters, em que foi relatado que o FSH pode alterar os níveis de GMPc, aumentando a atividade de PDE e conseqüentemente provocando queda no AMPc (HUBBARD E PRICE, 1998).

Em relação ao AMPc, no início da maturação (0h) seus níveis estavam em 0,43 pmol/*pool*, podendo ser depois observado um aumento significativo após 1 e 3 horas de maturação quando cultivados na presença do FSH (7,61 e 7,81 pmol/*pool*; $p < 0,05$). Mas quando cultivados na ausência do FSH os níveis se mantiveram baixos, não apresentando diferença entre os tempos e tratamentos em questão (0,30 e 0,76 pmol/*pool*; $p > 0,05$).

Após 6 horas de cultivo, os níveis no grupo cultivado com FSH caíram a valores similares ao observado no grupo cultivado na ausência do FSH (0,42 e 0,02 pmol/*pool*, *respectivamente*, $p > 0,05$; Figura V.4.)

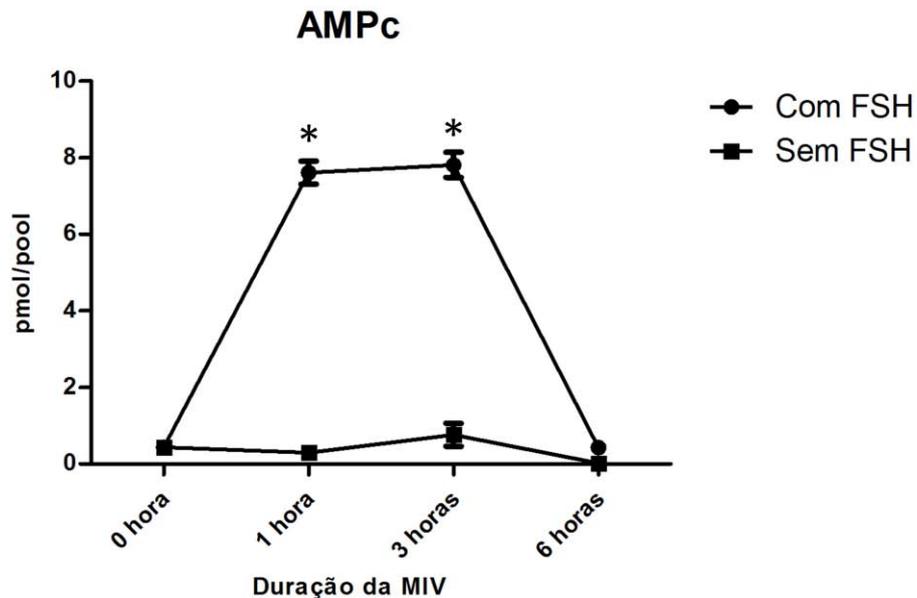


Figura V.4. Níveis de AMPc produzidos por CCO maturados na presença ou na ausência de FSH às 0, 1, 3 e 6 h de MIV. * indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos dentro de um mesmo horário.

O níveis de AMPc apresentaram um aumento durante a primeira e terceira hora de maturação quando na presença do FSH, confirmando os dados encontrados por Chen et al (2009). Este aumento deve-se a duas prováveis razões, ambas aumentando os níveis de AMPc por influência do FSH, sendo uma através da ativação da AC (LAPOLT et al. 2002) e outra pela ativação da degradação da PDE3 via GMPc, que nesse mesmo período se apresenta em alto nível (THOMAS et al. 2004) e este experimento. Similarmente aos níveis de GMPc, que também apresentaram um aumento nas primeiras horas de maturação, os níveis de AMPc apresentaram diminuição após 6 horas de maturação, tanto na presença como na ausência do FSH, corroborando com dados encontrados por Chen et al (2009), que também sugerem que o hormônio parece exercer alguma influência nos níveis de AMPc, via oócito.

Os altos níveis de GMPc podem também contribuir para uma lenta diminuição nos níveis de AMPc (VIVARELLI et al. 1983; TÖRNELL et al. 1990), justificando o comportamento encontrado também no atual experimento para os níveis de AMPc.

O fato de não haver efeito do FSH sobre os níveis de NO, sugere que o FSH pode ter influência direta nos nucleotídeos, já que os níveis de AMPc e de GMPc sofreram influência pelo FSH. Já os níveis de NO, não sofreram alterações significativas pelo o FSH, indicando que não estaria sendo influenciado pelo hormônio e, portanto não estaria ele afetando seu mensageiro usual, o GMPc, contradizendo os resultados encontrados por Tao et al (2004) em oócitos de suínos. Essas diferenças podem ser devido à variações entre as espécies ou de condições experimentais. O efeito do FSH, portanto, parece ser dado diretamente por ele nos níveis de GMPc e AMPc. Para determinar se o FSH afeta o AMPc via GMPc ou se eleva simultaneamente e independentemente os níveis de ambos, outros estudos deverão ser realizados.

5.4. Experimento 4: Influência do FSH e células do *cumulus* na expressão de genes das vias do NO, GMPc e AMPc.

Para determinar se o FSH influencia a expressão de genes de diferentes enzimas ou efetores das vias do NO/GMPc/AMPc, CCO e DO e foram maturados com e sem FSH e os oócitos (CCO e OD) e células do cumulus (dos CCO) foram avaliados antes e após a MIV.

A figura V.5. apresenta a expressão relativa do gene da enzima NOS2, uma das isoformas responsáveis pela síntese de NO. A figura V.6. apresenta a expressão relativa dos genes ligados ao controle dos níveis de GMPc ou de enzimas ativadas por ele (PDE5A, PDE6C, PKG1 e PKG2) e as figuras V.7. e V.8. apresentam a expressão relativa dos genes ligados ao controle dos níveis de AMPc ou de enzimas ativadas por ele (ADCY6, ADCY9, PDE3A e PKA1). Para aplicação estatística todos os genes tiveram sua expressão relativa normalizada em relação ao gene endógeno PPIA.

O gene NOS2 foi detectado tanto em oócitos como em células do *cumulus* e em todos os grupos experimentais. Para ambos os grupos CCO e OD, observou-se uma queda nos transcritos após 24 horas de maturação com ou sem FSH no cultivo. No entanto, em CCO com FSH, a queda foi mais acentuada que no CCO sem FSH ($P < 0,05$). No grupo maturado sem as suas células do cumulus (OD) a queda foi maior que no grupo CCO sem FSH

($P < 0,05$), mas foi similar ao grupo CCO com FSH ($P < 0,05$). No grupo OD, o FSH não influenciou a abundância dos transcritos, mas apenas o processo de maturação, visto que ambos os grupos foram similares ($P > 0,05$).

Nas células do *cumulus* algo semelhante foi observado, havendo também uma queda nos transcritos ($P < 0,05$) após a MIV na presença e na ausência do FSH, sendo ela mais acentuada quando na presença do hormônio, embora a diferença não tenha sido significativa ($P > 0,05$).

Esta queda nos transcritos da NOS2 após a maturação, reflete resultados já encontrados anteriormente por Pires et al (2009) e Tesfaye et al (2006), porém, mostra também que a queda dos transcritos apenas da NOS2 não é suficiente para alterar os níveis de NO após a maturação, como sugerido por Tesfaye et al (2006). O fato de que a queda dos transcritos da NOS2 não tenha alterado os níveis de NO, e que estes níveis não alteraram as taxas de maturação tanto em CCO como para OD, podemos sugerir que os níveis de NO, que podem influenciar a taxas de maturação (SCHWARZ et al. 2007; SCHWARZ et al. 2008), são controlados por outros mecanismos e não diretamente pelo FSH. Desta forma, o que parece ocorrer é que mesmo que o FSH induza uma redução do RNAm de NOS2, pode ser que a proteína que esteja presente mantenha sua atividade sem sofrer influência do FSH. Além disso, oócitos e células do *cumulus* apresentam também outra isoforma, a NOS3 (Pires et al. 2009), que pode estar mantendo a estabilidade da síntese de NO, mesmo que o FSH reduza os transcritos da NOS2. Para um melhor entendimento neste caso, teria que averiguar-se o efeito independente do FSH sobre a NOS3.

A PDE6C não foi detectada em células do *cumulus*, no entanto, nos grupos CCO e OD ela foi detectada, mas sem diferença entre os grupos e tratamentos ($p > 0,05$). Já a PDE5A, apresentou um aumento significativo somente no grupo OD quando maturado na ausência do FSH ($p < 0,05$), não apresentando diferença para os demais grupos. Em células do *cumulus*, embora um aumento aparente tenha sido observado quando maturadas na presença do FSH, este não foi significativo. Nossos resultados corroboram com Sasseville et al (2008), que mostraram em complexo oócito-*cumulus* de suínos a presença do transcrito e da proteína referente a PDE5A e PDE6C. Estes autores mostraram também que após o período de maturação, os transcritos

para ambas as PDE, foram traduzidos, já que a presença da proteína foi detectada em maior abundância. Wang et al (2008) também mostraram a presença de transcritos de PDE5A em oócitos e células do *cumulus* de camundongos, porém não avaliaram quanto a presença da proteína.

Wang et al (2008) observaram que a inibição da PDE5A influenciou diretamente a maturação espontânea de oócitos de camundongos, demonstrando relação entre GMPc e AMPc, sendo que a própria PDE5A é responsável pela degradação do GMPc. Esses autores sugeriram que a maturação de oócitos em camundongos não é dependente apenas da via GMPc-PKG, e sim de uma interação entre GMPc e AMPc. Estes dados corroboram, em parte, o observado em nossos experimentos, que demonstraram a presença da PDE5A tanto em oócitos como em células do *cumulus* de bovinos. A presença ou não do FSH durante a maturação no grupo CCO não causou alterações nos transcritos, já no grupo OD, um aumento dos transcritos foi observado na presença do FSH durante a maturação. Este aumento observado pode ser justificado a partir de dois pressupostos: 1) de que a alteração destes transcritos ocasionada durante a maturação foi devido a uma influência do FSH, partindo da hipótese de que há presença de receptores de FSH em oócitos, que já foram verificados em humanos (Méduri et al. 2002; Patsoula et al. 2003) e em camundongos (Patsoula et al. 2001); ou 2) de que a ausência das células do *cumulus* durante a maturação desencadeou um comportamento diferenciado do oócitos durante a maturação, ou seja, que as células do *cumulus*, quando presentes teriam um efeito inibitório sobre a expressão nos oócitos e que uma vez ausentes as células, o efeito inibitório cessaria, permitindo ao oócito expressar o gene. Não há relatos na literatura de experimentos envolvendo tratamento com gonadotrofinas influenciando a PDE6C.

A PDE5A e PDE6C não foram afetadas diretamente em todos os grupos e tratamentos, mas como ambas fazem parte mecanismo de degradação, talvez um aumento possa ser observado no início da maturação, logo após a queda dos níveis de GMPc. Após essa redução destes níveis, os transcritos talvez sejam degradados por não serem mais necessários. Estudos mais detalhados são necessários para se confirmar essa possibilidade.

Os genes PKG1 e PKG2 apresentaram comportamentos distintos para os grupos CCO e OD, porém, nenhum dos dois foi detectado em células do *cumulus*. Enquanto a PKG2 não apresentou diferença para os grupos CCO e OD com ou sem FSH ($p > 0,05$), a PKG1, quando a maturação ocorreu na presença do FSH, apresentou um aumento significativo em ambos os grupos ($P < 0,05$), sugerindo um efeito estimulatório do FSH na expressão desse gene, diretamente nos oócitos, mesmo na ausência das células do *cumulus* durante a maturação.

Entre os genes PKG1, PKG2 e PDE6C apenas o PKG1 apresentou diferença entre tratamentos em ambos os grupos CCO e OD, e nenhum dos três foi detectado em células do *cumulus*. Não foram encontrados relatos sobre a presença ou não e/ou o comportamento destas PKGs frente à utilização do FSH durante a MIV. No entanto, Orstavik et al (1997) observaram ambas as PKGs em complexos *cumulus*-oócito de camundongos, confirmando o que foi observado em nosso experimento.

Apesar da PKG1 ter sido observada apenas em oócitos, esse gene apresentou um comportamento particularmente interessante. A utilização do FSH induziu um aumento nos transcritos, tanto na presença como na ausência das células do *cumulus*, indicando que possivelmente o FSH teve influência neste gene durante a maturação, já que o aumento de transcritos para a PKG1 coincide com o aumento do GMPc avaliado no experimento anterior e a PKG1 é uma enzima dependente do GMPc.

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.

O fato, porém, de termos detectados três dos quatro genes estudados apenas em oócitos nos sugerem que o controle destes níveis de expressão é, em grande, parte proveniente de mecanismos oocitários.

Em relação ao controle dos níveis de AMPc foram analisados os genes ADCY6 ADCY9, envolvidos na síntese, a PDE3A envolvidas na degradação do AMPc e a PKA1 que é uma proteína dependente de AMPc.

A ADCY6 foi detectada em oócitos e células do *cumulus*. Quando na presença do FSH durante a maturação, observou-se um aumento destes

transcritos em CCO ($p < 0,05$), porém no grupo OD, o aumento destes transcritos foi observado quando a maturação foi feita sem o hormônio ($p < 0,05$). Em células do *cumulus* houve um aumento nos transcritos quando maturados na presença do FSH ($p < 0,05$), enquanto que na ausência do mesmo não houve diferença ($p > 0,05$).

A ADCY9 também foi detectada em oócitos e células do *cumulus*, e apresentou expressão similar entre CCO e OD com ou sem FSH ($p > 0,05$). Já nas células do *cumulus* houve um efeito da maturação ocasionando uma queda destes transcritos ($p < 0,05$), mas não havendo efeito da presença do FSH ($P > 0,05$). Mesmo não havendo diferença entre os tratamentos em células do *cumulus*, pôde-se observar uma queda mais acentuada dos transcritos quando maturados na presença do FSH.

A PD3A foi detectada apenas em oócitos (grupos CCO e OD), e apresentou comportamentos distintos em relação aos tratamentos, sendo que quando na presença FSH, os CCO apresentaram aumento nos transcritos ($p < 0,05$), e os OD não apresentaram diferença ($p > 0,05$). Quando na ausência do FSH, foi observado um comportamento inverso, o grupo CCO não apresentou diferença ($p > 0,05$), e o grupo OD apresentou um aumento nos transcritos ($p < 0,05$).

A PKA1 foi detectada em todos os grupos e tratamentos, apresentando um aumento apenas no grupo OD quando maturado na ausência do FSH ($p < 0,05$), os demais grupos e tratamentos não apresentaram diferença entre eles ($p > 0,05$). Em células do *cumulus* não houve diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$).

A identificação da ADCY6 e 9 em nosso experimento corroboram com dados encontrados por Lastro et al (2006), que também observaram a presença das mesmas em células do *cumulus* e da granulosa em bovinos. Asbóth et al (2001) também observaram ambas as isoformas em células da granulosa de humanos. Ambas as isoformas foram influenciadas pelo FSH, sendo essa influência positiva em oócitos e células do *cumulus* para ADCY6 e negativa somente em células do *cumulus* para ADCY9. Essas observações sugerem que o FSH influencie na expressão da AC, mas de forma diferenciada em relação à isoforma e ao tipo de célula. Essa observação demonstra uma

grande complexidade na relação oócito-células do cumulus em relação ao controle dos níveis de AMPc pelo FSH.

Um comportamento diferenciado foi observado para os genes PDE5A, ADCY6, PDE3A e PKA1. Estes genes tiveram um aumento significativo em seus transcritos para o grupo OD na ausência do FSH durante o cultivo. O gene PKG1 também apresentou uma alteração no grupo OD, porém, quando cultivado na presença do FSH, apresentando um aumento nestes transcritos. Uma suposição para este evento é de que além das células do *cumulus* parecerem de alguma forma inibir a expressão de alguns genes, o FSH também parece apresentar um efeito direto em oócitos. Outros estudos são necessários para se evidenciar essas hipóteses.

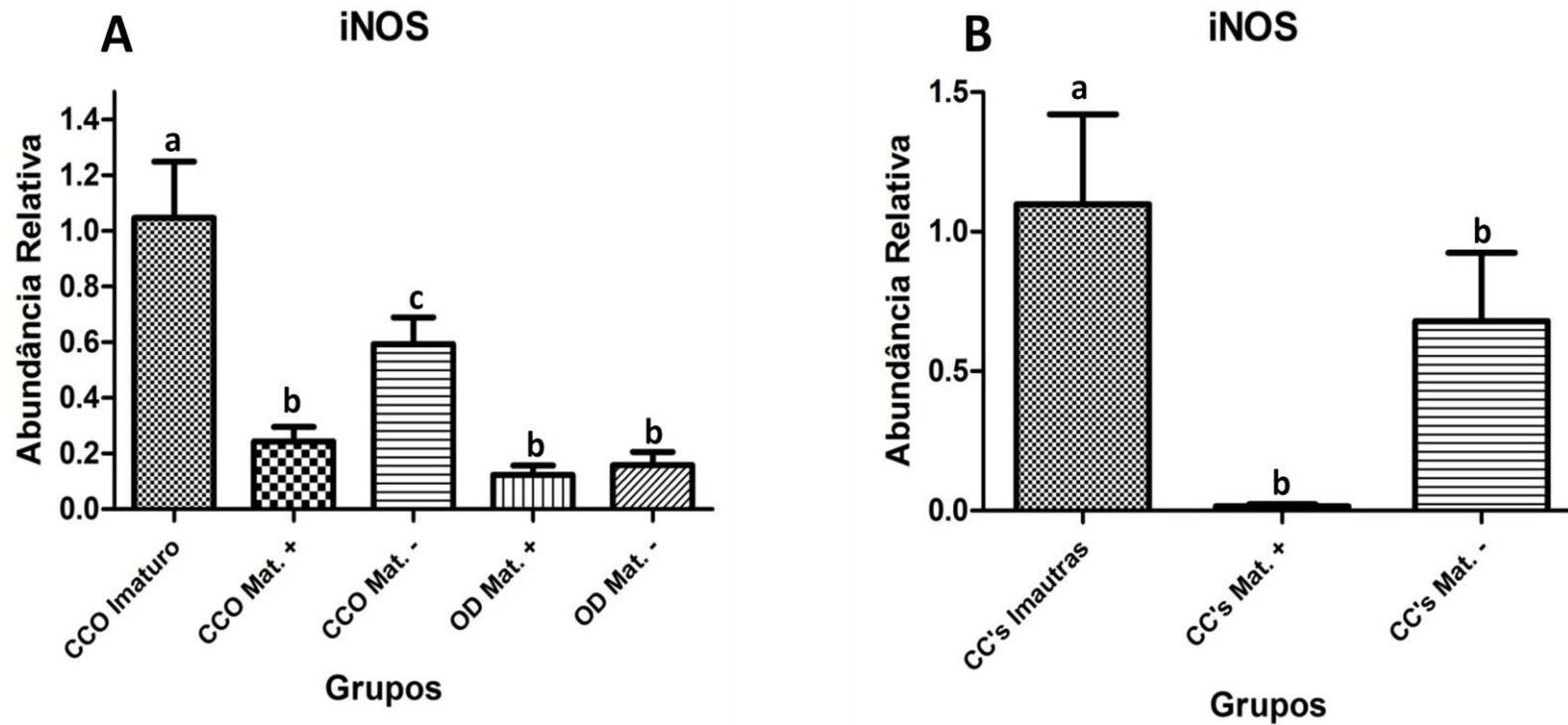


Figura V.5. Abundância relativa de transcritos e erro padrão do gene NOS2 estimado pelo PCR em tempo real. (A) Oócitos maturados com suas células do cumulus (CCO) ou sem as mesmas (OD) por 24 h em meio de MIV com (+) ou sem (-) FSH. (B) Células do cumulus (CC) dos respectivos CCOs. As barras de erro nas colunas indicam variações entre as repetições de cada grupo. Letras diferentes dentro do mesmo gráfico apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

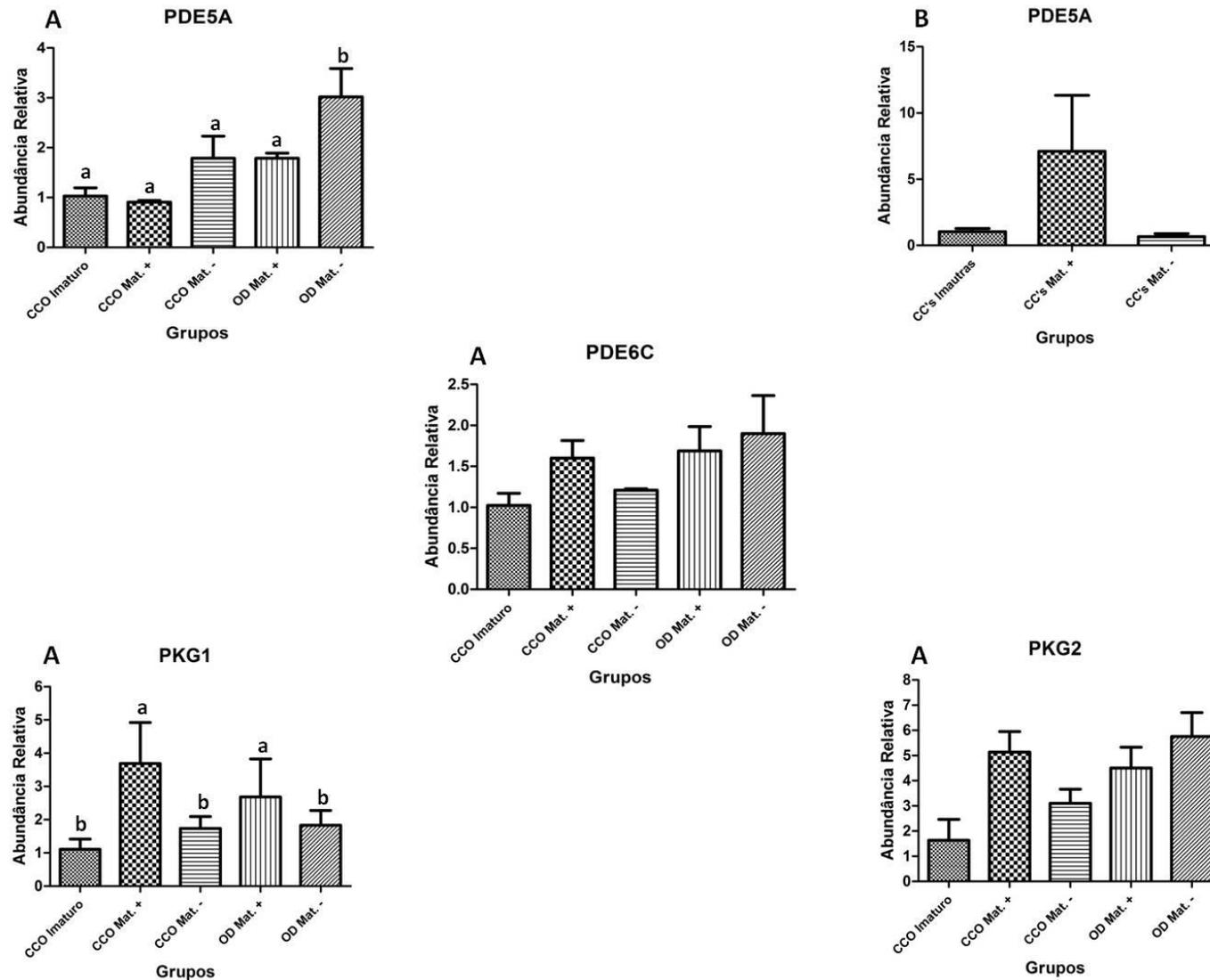


Figura V.6. Abundância relativa de transcritos e erro padrão dos genes PDE5A, PDE6C, PKG1 e PKG2 estimados pelo PCR em tempo real. (A) Oócitos maturados com suas células do cumulus (CCO) ou sem as mesmas (OD) por 24 h em meio de MIV com (+) ou sem (-) FSH. (B) Células do cumulus (CC) dos respectivos CCOs. As barras de erro nas colunas indicam variações entre as repetições de cada grupo. Letras diferentes dentro do mesmo gráfico apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

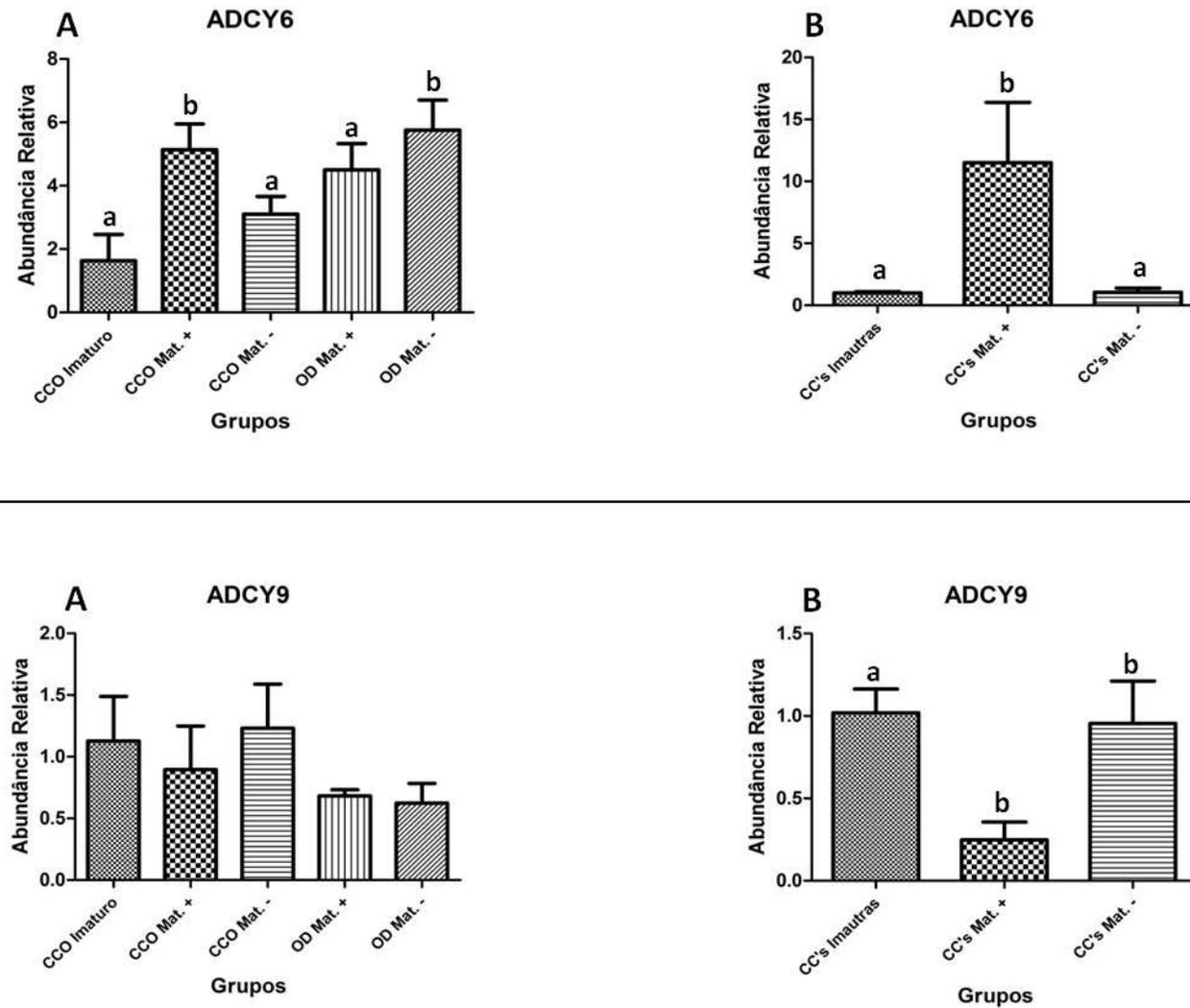


Figura V.7. Abundância relativa de transcritos e erro padrão dos genes ADCY6 e ADCY9 estimados pelo PCR em tempo real. (A) Oócitos maturados com suas células do cumulus (CCO) ou sem as mesmas (OD) por 24 h em meio de MIV com (+) ou sem (-) FSH. (B) Células do cumulus (CC) dos respectivos CCOs. As barras de erro nas colunas indicam variações entre as repetições de cada grupo. Letras diferentes dentro do mesmo gráfico apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

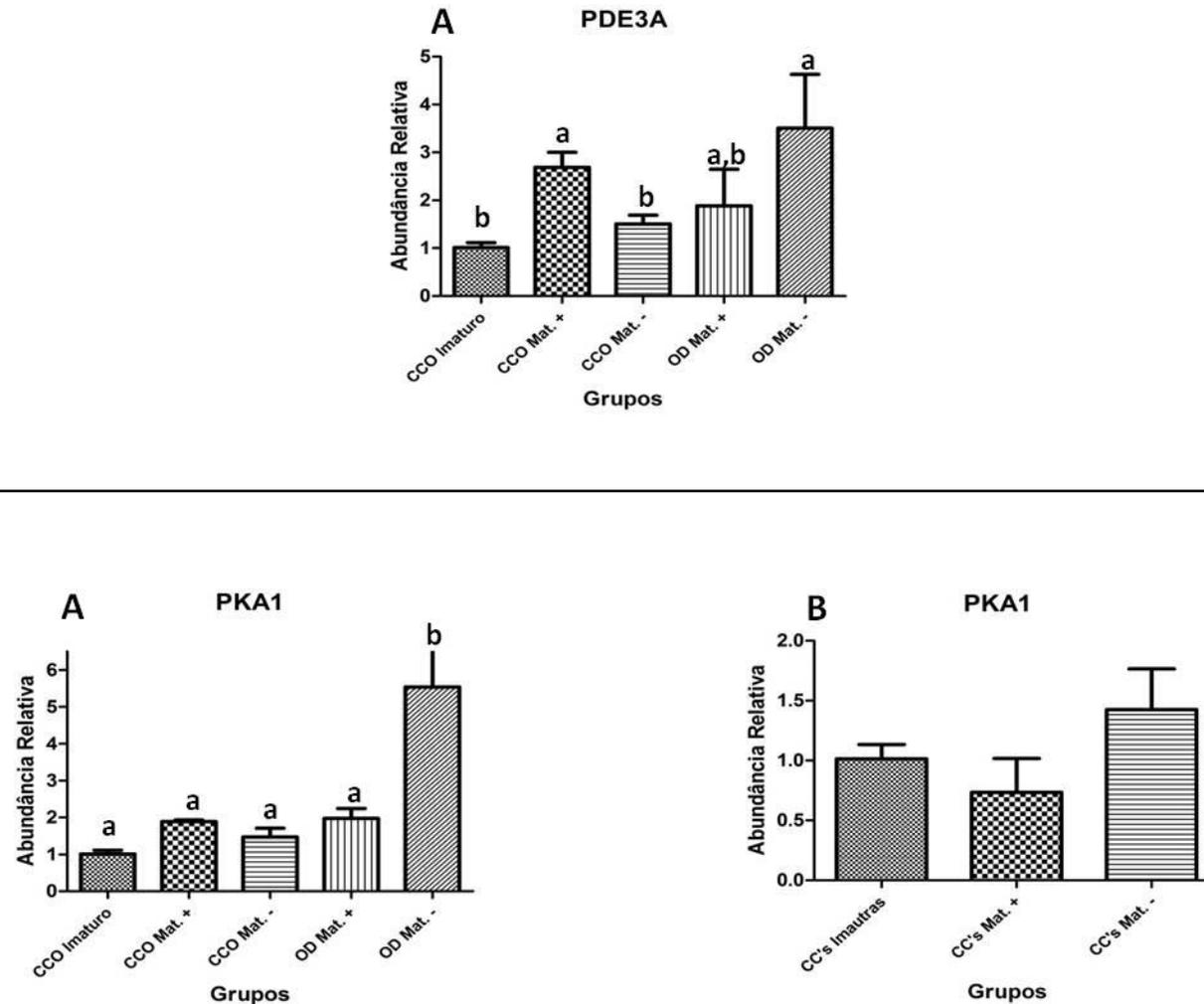


Figura V.8. Abundância relativa de transcritos e erro padrão dos genes PDE3A e PKA1 estimados pelo PCR em tempo real. (A) Oócitos maturados com suas células do cumulus (CCO) ou sem as mesmas (OD) por 24 h em meio de MIV com (+) ou sem (-) FSH. (B) Células do cumulus (CC) dos respectivos CCOs. As barras de erro nas colunas indicam variações entre as repetições de cada grupo. Letras diferentes dentro do mesmo gráfico apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- 1) O FSH exerce influência positiva nas taxas de maturação nuclear de oócitos bovinos, mesmo na ausência das células do *cumulus*;
- 2) O FSH não interfere nos níveis de NO, na presença ou não das células do *cumulus* durante na maturação oocitária;
- 3) Os níveis de AMPc e GMPc são influenciados pelo FSH durante as primeiras horas da maturação com um aumento inicial dos níveis seguido de queda para ambos os nucleotídeos.
- 4) O FSH e as células do *cumulus* podem influenciar na expressão de genes dos oócitos, e o FSH também pode influenciar na expressão de genes das células do *cumulus*.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ABRIEU, A.; DOREE, M.; FISHER, D., The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. **J Cell Sci**, v.114, n.2, p.257-67, 2001.

ADONA, P.R. et al. Expressão dos genes eNOS e iNOS em ovócitos bovinos submetidos à pré-maturação e/ou maturação in vitro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p. 1309, 2007. (Resumo). Suplemento 1.

AKTAS, H.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; FIRST, N.L. Meiotic state of bovine oocytes is regulated by interactions between cAMP, cumulus, and granulosa. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.65, p.336–343, 2003.

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

BASINI, G; TAMANINI, C. Selenium stimulates estradiol production in bovine granulosa cells: possible involvement of nitric oxide. **Dom. Anim. Endocrin.** v.18, p.1-17, 2000.

BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. **Theriogenology**.v.60, p.1679-1690, 2003.

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

CALDER, M.D. et al. Effect of serum and cumulus expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte complex during maturation in vitro. **Fertility and Sterility**, v.83, p.1077-1084, 2005.

CALDER, M.D. et al. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro.

Reprod Biol Endocrinol, p.1-14, 2003.

CHATTERJEE, S. et al. Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase-III in reproductive organs of female rats during the oestrous cycle. **Histochem J.** v.28, p.715-723, 1996.

CHEN, J.; DOWNS, S.M. AMP-activated protein kinase is involved in hormone-induced mouse oocyte meiotic maturation in vitro. **Dev Biol.** v.313, p.47-57, 2008.

CHEN, J. et al. AMPK regulation of mouse oocyte meiotic resumption in vitro. **Dev Biol.** v.291, p.227-38.2006.

CHEN, J. et al. cAMP pulsing of denuded mouse oocytes increases meiotic resumption via activation of AMP-activated protein kinase. **Reproduction and Fertility**, v.138, p. 759-770, 2009.

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

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.

DUCKWORTH, B.C.; WEAVER, J.S. RUDERMAN JV. G₂ arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. **PNAS**, v. 99, p.16794-16799, 2002.

EYERS, P.A. et al. Regulation of the G(2)/M transition in *Xenopus* oocytes by the cAMP-dependent protein kinase. **J Biol Chem.** v.280, p.24339-46, 2005.

FISSORE, R.A.; HE, C.L.; VAN DE WOUDE, G.F. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. **Biol. Reprod.** v. 55, p. 1261-1270, 1996.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro

percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Ver. Ass. Med. Brasil.** v.46, p.265-271, 2000.

FU, M. et al. Luteinizing hormone receptors expression in cumulus cells closely related to mouse oocyte meiotic maturation. **Frontiers in Bioscience**, v.12, p.1804-1813, 2007.

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

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.'

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. FSH suppression of nitric oxide synthesis in porcine oocytes. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.24, p.65-73, 2000.

HAUGHIAN, J.M. et al. Relationships between FSH patterns and follicular dynamics and the temporal associations among hormones in natural and GnRH-induced gonadotropin surges in heifers. **Reproduction**. v.127, p.23-33, 2004.

HYTTEL, P. et al. Oocyte growth capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p23-32, 1997.

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.; BASURAY, R.; OLSON, L.M. Inhibitors of nitric oxide synthase influence oocyte maturation in rats. **J Soc Gynecol Investig**. V.6, p.95-101, 1999.

JABLONKA-SHARIFF, J.; OLSON, L.M. Nitric oxide is essential for optimal

meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes in vitro. **Mol Reprod Dev**, v.55, p.412-421, 2000.

JABLONKA-SHARIFF, J.; 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**, v.139, p.2944-2954, 1998.

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

KANO, F. et al. MEK and Cdc2 kinase are sequentially required for Golgi disassembly in MDCK cells by the mitotic Xenopus extracts. **J Cell Biol**, v.149, n.2, p.357-68, 2000.

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.

KUBELKA, M. et al. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, Without influencing chromosome condensation activity. **Biol Reprod**, v.62, n.2, p.292-302, 2000.

KUO, R.C. et al. NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization. *Nature*, v.406, p.633-636, 2000.

LAFORREST, 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.

LAPOLT, P.S. et al. Roles of cyclic GMP in modulating ovarian functions. **Reproduction Biomedicine**, v. 6, p. 15-23, 2002.

LASTRO, M.; COLLINS, S.; BRUCE CURRIE, W. Adenylyl cyclases in oocyte maturation: A Characterization of AC isoforms in bovine cumulus cells. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.1202–1210, 2006.

LEFEBVRE, C. et al. Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MIS S), a new MAPK substrate. **J Cell Biol**, v.157, n.4,

p.603-13, 2002.

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.

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.

LONERGAN, P. et al. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Mol Reprod Dev**, v. 37, p.48-53, 1994.

LUGNIER, C.; et al. Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms associated to isolated cardiac nuclei. **Biochim Biophys Acta**. v.1472, p.431-46, 1999.

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.

MÉDURI, G. et al. Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes? **Journal of Clinical Endocrinological Metabolism**, v. 87, p.2266-2276, 2002.

MEINECKE, B. et al. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reproduction in Domestic Animals**, v.36,p.183-188, 2001.

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**, v.19, p.30-40, 2004.

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.

NAKAMURA, Y. et al. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. **Biol Reprod**, v.67, p.1588-1592, 2002.

NATORI, M.M. et al. Detecção da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em ovários bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p. 338, 2005.

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.424-429, 2000.

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.

NUTTINCK, F. et al. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. **Domestic Animal Endocrinology**, v.27, p.179-195, 2004.

ORSTAVIK S, N.A. et al. Characterization of the human gene encoding the type I alpha and type I beta cGMP-dependent protein kinase (PRKG1). **Genomics**. v.42, p.311-8, 1997.

PATSOULA, E. et al. Expression of mRNA for the LH and FSH receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 121, p. 455-461, 2001.

PATSOULA, E. et al. Messenger RNA expression for the follicle-stimulating hormone receptor and luteinizing hormone receptor in human oocytes and

preimplantation-stage embryos. **Fertility and Sterility**, v.79, p.1187-1193, 2003.

PIRES, P.R. et al. Endothelial and inducible nitric oxide synthases in oocytes of cattle. **Anim Reprod Sci.** v.116, p.233-243, 2009.

REYES, R.; VÁZQUEZ, M.L.S.; DELGADO, .NM. Detection and bioimaging of nitric oxide in bovine oocytes and sperm cells. **Arch Androl**, v.50:303-309, 2004.

RICHARD, F.J.; TSAFRIRI, A.; CONTI, M. Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation. **Biol Reprod.** V.65, p.1444-51, 2001.

RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.234-248, 2002.

RODRIGUEZ, K.F. et al. Roles of gene transcription and PKA subtype activation in maturation of murine oocytes. **Reproduction**, v123, p.799–806, 2002.

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

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.

SCHWARZ, K.R.L. Atividade do sistema óxido nítrico sintase/óxido nítrico em oócitos bovinos, **FZEA – USP**, 2007. 63p.

SEDMIKOVÁ, M. et al. The effect of nitric oxide on porcine oocyte activation. In: **International Congress on Animal Reproduction**, Porto Seguro, 2004, Anais, v.2, p.450. (Resumo).

SELA-ABRAMOVICH, S. et al. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. **Endocrinology**, v. 147, p. 2280-2286, 2006.

SENGOKU, K. et al. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryos development, and trophoblast outgrowth in vitro. **Mol Reprod Dev**, v.58, p.262-268, 2001.

SHENG, J. et al. A. Dissection of c-mos degran. **The EMBO Journal**, v.21, p.6061-71, 2002.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v.49, p.483-497, 1998.

SIROTKIN, A.V. et al. Effect of cGMP analogues and protein kinase G blocker on secretory activity, apoptosis and the cAMP/protein kinase A system in porcine ovarian granulosa cells in vitro. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.74, p.1-9, 2000.

SU, Y.Q. et al. Involvement of MEK-mitogen-activated protein kinase pathway in follicle-stimulating hormone-induced but not spontaneous meiotic resumption of mouse oocytes. **Biol Reprod**, v.56, p.358-365, 2001.

SUN, Q.Y. et al. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. **Reproduction**. v.122, p.155-163, 2001.

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 endothelial nitric oxide synthase gene in cultured porcine granulosa cells after FSH stimulation. **J Mol Endocrin**, v.26, p.259-265, 2001.

TAKESUE, K. et al. Expression of endothelial nitric oxide synthase gene in cultured porcine granulosa cells after FSH stimulation. **J Mol Endocrin**, v.26, p.259-265, 2001.

TAKESUE, K. et al. Fluorescent observation of nitric oxide synthesized by the porcine oocyte. **Biol Reprod**, v.60, p.447, 1999.

TAKESUE, K. et al. Expression of nitric oxide synthase-3 in porcine oocytes

obtained at different follicular development. **J Reprod Dev**, v.49, p.135-140, 2003.

TAO, Y. et al. Regulation between nitric oxide and MAPK signal transduction in mammals. **Progress in Natural Science**, v.15, p.1-9, 2005.

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.

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.** v.41, p.501-509, 2006.

THALER, C.D.; EPEL, D. Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: a little dab'll do ya. **Curr Pharm Des**, v.9, p.399-409, 2003.

THOMAS, R.E.; ARMSTRONG, D.T.; GILCHRIST, R.B. Bovine Cumulus Cell-Oocyte Gap Junctional Communication During *in vitro* Maturation in Response to Manipulation of Cell-Specific Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Levels. **Biology Of Reproduction**, v. 70, p. 548–556, 2004.

TÖRNELL, J.; BILLIG, H.; HILLEN SJÖ, T. Resumption of rat oocyte meiosis is paralleled by a decrease in guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) and is inhibited by microinjection of cGMP. **Acta Physiol. Scand**, v.139, p. 511-517, 1990.

TRANGUCH, S.; STEUERWALD, N.; HUET-HUDSON, Y.M. Nitric oxide synthase and nitric oxide regulation of preimplantation of embryo development. **Biol Reprod**, v.68, p.1538-1544, 2003.

TSAFRIRI, A.; CHUN, SY; ZHANG, R; HSUEH, AJW; CONTI, M. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of camp levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. **Dev Biol**, v.178, p.393–402, 1996.

VIANA, K.S. et al. Effect of sodium nitroprusside, a donor of nitric oxide, in cinetic of cumulus cell-oocyte complex expansion and germinal vesicle breakdown in bovine oocytes. In: **International Congress on Animal Reproduction**, Porto Seguro, 2004, Anais, v.2, p.441. (Resumo).

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, 2007.

WILDING, M. et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. **Human Reproduction**, v.16, p.909-917, 2001.

ZERON, Y. et al. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**. v.121, p.447-54, 2001.

ZHANG, M. et al. Gonadotropin-controlled mammal oocyte meiotic resumption. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p.282-296, 2007.