**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

FABIANE GILLI ZAFFALON

**Influência de diferentes isoformas de fosfodiesterases no controle
da maturação de oócitos bovinos**

**Pirassununga
2014**

FABIANE GILLI ZAFFALON

**Influência de diferentes isoformas de fosfodiesterases no controle
da maturação de oócitos bovinos**

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

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Lima Verde Leal

Pirassununga
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

Z17i Zaffalon, Fabiane Gilli
 Influência de diferentes isoformas de fosfodiesterases no controle da maturação de oócitos bovinos / Fabiane Gilli Zaffalon. -- Pirassununga, 2014.
 91 f.
 Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Medicina Veterinária.
 Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.
 Orientadora: Profa. Dra. Claudia Lima Verde Leal.

 1. Maturação oocitária 2. AMPc 3. GMPc
 4. Gonadotrofinas 5. Fertilização *in vitro*. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ZAFFALON, Fabiane Gilli

Título: **Influência de diferentes isoformas de fosfodiesterases no controle da maturação de oócitos bovinos**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedico com muito amor...

À minha MÃE,

*Que me deu força, dia após dia, nesses três anos de doutorado,
“exalando” amor e carinho maternal!*

Ao meu PAI,

*Amor incondicional da minha vida, não encontro palavras para escrever
o quanto sou grata... A saudade é cada dia maior!*

Aos meus IRMÃOS e CUNHADAS,

Que me ensinam, cada um a seu modo, o que é ser uma família!

Aos meus SOBRINHOS,

O trio que completa a minha vida!

AGRADECIMENTOS

Antes de agradecer peço desculpas, pois serei breve nas palavras, mas tenham a certeza que sou eternamente grata a todos vocês citados aqui e também aqueles que me ajudaram e por um descuido e pressa na hora de escrever os agradecimentos eu não tenha citado aqui...

À **Professora Cláudia Lima Verde Leal**, por ser extremamente solícita e paciente comigo. Sou grata por me aceitar na sua equipe e me proporcionar a realização de um sonho, o de conhecer uma universidade fora do Brasil!

Ao **Professor André F. C. de Andrade** pela ajuda imensa na realização da análise estatística.

À **Yeda Watanabe** pela ajuda, também imensa, na realização da fertilização *in vitro*.

Ao **Juliano Sangalli** pela ajuda com a ativação partenogenética e ao **Juliano da Silveira** pelas dúvidas tiradas com o western blotting.

Ao **Pedrinho e Lígia** que foram pacientes e me ajudaram no “início” com os ovários e sempre que preciso de uma “ajudona” extra.

Ao pessoal: **Carol, Ramon, Kátia, Fernanda, Hugo, Helena** valeu pelas risadas e ajudas com os ovários.

Ao **Léo** pelo trabalho de coletar os ovários.

Ao pessoal de todo o laboratório agradeço pelo convívio e conversas: **Nina, Márcia, Sílvia, Martini, Marquinho, Rafael, Tiago, Laís, Alana**.

Aos **funcionários da secretaria de pós-graduação** pelas dúvidas esclarecidas.

Às minhas amigas: **Alice, Mari, Paty, Simone, Renata e Talita** imagino que não tenha sido muito fácil me aguentar esses últimos anos e vocês foram “guerreiras”.

Aos meus tios (uns de verdade, outros de coração) que me apoiam sempre: **Edson, Graça, Osório e Cleusa** e a minha prima **Zeca**.

Aos amigos **Joaquim, Pedro, Catarina e Maria** que me ajudam demais.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

ZAFFALON, F. G. Influência de diferentes isoformas de fosfodiesterases no controle da maturação de oócitos bovinos. 2014. 91 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

A maturação *in vitro* do oócito é um dos fatores limitantes na produção *in vitro* de embriões. *In vivo*, esta maturação é um processo altamente orquestrado no qual a meiose é retomada pela onda de gonadotrofina que antecede a ovulação e que induz à queda dos níveis de AMPc no oócito. No entanto, os oócitos aspirados ao serem retirados dos folículos ovarianos retomam espontaneamente a maturação comprometendo a competência de seu desenvolvimento. O AMPc é sintetizado pela adenilato ciclase (AC) e degradado pelas fosfodiesterases (PDE), existindo algumas relacionadas à degradação do AMPc e outras do GMPc. Sendo assim, a proposição deste trabalho foi averiguar a contribuição de diferentes isoformas de fosfodiesterases na retomada da meiose e nos níveis de GMPc, AMPc e ainda, determinar quando há manutenção de AMPc em níveis elevados observando sua influência na competência oocitária e ativação da MAPK. Para isso, os complexos cumulus-oócito (CCOs) foram maturados *in vitro* na ausência, presença ou associação de inibidores de PDEs-AMPc e GMPc específicas e FSHr. As amostras foram avaliadas em relação a: 1) taxa de maturação; 2) níveis intracelulares de AMPc e GMPc nos CCOs; 3) taxa de desenvolvimento de blastocistos ; 4) ativação da MAPK em oócitos e células do cumulus. Os resultados obtidos no primeiro experimento indicaram que o inibidor da PDE3 foi o mais eficaz ($p<0,05$) em atrasar a retomada da meiose, às nove horas de maturação, porém, isolado ou em

associação com o inibidor da PDE8, não foi capaz de alterar ($p>0,05$) os níveis de AMPc. No experimento dois, o inibidor da PDE5 isolado não influenciou a retomada da meiose ($p>0,05$), porém, quando associado aos inibidores da PDE3 e 8 houve atraso na retomada ($p<0,05$) e ainda alteraram os níveis de GMPc e AMPc ($p<0,05$) nas primeiras horas de maturação. O experimento três mostrou a influencia do FSHr durante a MIV, o qual estimulou a retomada da meiose, mas em associação com inibidores da PDE5 e 8 atrasa a retomada ($p<0,05$). Além disso, o FSHr provoca aumento do nível de AMPc e sua associação com inibidores de PDE5 e PDE8 ocasionou elevação adicional ($p<0,05$). As condições de cultivo estudadas no experimento quatro mostraram que a maturação induzida (pré-MIV de duas horas com agentes para elevar AMPc seguindo de 22 horas de MIV com FSH associado a inibidores de PDEs) atrasaram a retomada da meiose às nove horas de maturação, mas não afetaram progressão da meiose às 24, 28 e 30 horas. Os tratamentos, porém, não melhoraram a competência oocitária após a fertilização *in vitro* e ocasionaram pequenas variações na ativação da MAPK em oócitos e células do cumulus.

Palavras-chave: maturação oocitária; AMPc; GMPc; gonadotropinas; fertilização *in vitro*.

ABSTRACT

ZAFFALON, F. G. Influence of different phosphodiesterase isoforms on the control of bovine oocyte maturation. 2014. 91 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

In vitro maturation of oocytes is a limiting factor in the in vitro production of bovine embryos. In vivo, this maturation is a highly orchestrated process in which meiosis resumption by the gonadotropin surge that precedes ovulation induces the decrease in cAMP levels in the oocyte. However, when oocytes are removed from follicles, they spontaneously resume maturation compromising the competence for its development. cAMP is synthesized by adenylyl cyclase (AC) and degraded by phosphodiesterases (PDE), and there are some PDEs related to degradation of cAMP and/or cGMP. Thus, the purpose of this work was to investigate the contribution of different isoforms of phosphodiesterases in the resumption of meiosis and levels of cAMP and, also, to determine differences in signaling pathways when maintaining high levels of cAMP and its influence on oocyte competence. For this purpose, cumulus-oocyte complexes (COC) were matured in vitro in the presence, absence or combination of inhibitors of cAMP- and cGMP-specific PDEs and FSH. Samples were evaluated in relation to: 1) maturation rate, 2) intracellular levels of cAMP and cGMP in COCs, 3) rate of blastocyst development and 4) activation of MAPK in oocytes and cumulus cells. The results of the first experiment showed that the PDE3 inhibitor is more effective ($p < 0.05$) in delaying meiosis resumption, at nine hours of maturation, but was not capable of altering cAMP levels ($p > 0.05$) either alone or in combination with the PDE8 inhibitor. In experiment two, the PDE5 inhibitor alone did not affect the meiosis resumption ($p > 0.05$), however, when associated with PDE3 and PDE8 inhibitors it delayed their resumption ($p < 0.05$) and also altered cGMP and cAMP levels of ($p < 0.05$) in the early hours of maturation. The third experiments showed the influence of FSHr during IVM, which stimulated the resumption of meiosis, but in combination with PDE5 and PDE8 inhibitors meiosis was delayed ($p < 0.05$). Furthermore, FSHr causes increased levels of cAMP and its association with PDE5 and PDE8 inhibitors caused an additional increase ($p < 0.05$).

Culture conditions studied in experiment four showed that induced maturation (pre-IVM for two hours with agents to elevate cAMP followed by 22 hours IVM with FSH associated with PDE inhibitors) delayed the resumption of meiotic maturation at nine hours, but has no effect on meiosis progression at 24, 28 and 30 hours. The treatments, however, did not improve oocyte competence after in vitro fertilization and caused minor variations in the activation of MAPK in oocytes and cumulus cells.

Key words: oocyte maturation, cAMP, cGMP, gonadotropin, in vitro fertilization.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
h	hora
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
N	normal
AC	adenilato ciclase
AMPc	adenosina 3´- 5´ monofosfato cíclica
anti-IgG	anticorpo gamaglobulina
ATP	adenosina trifosfato
CCO	complexo cumulus – oócitos
CCOs	complexos cumulus – oócitos
CO₂	dióxido de carbono
DMSO	dimetilsulfóxido
et al	entre outros
FIV	fecundação <i>in vitro</i>
ERK	cinases reguladas por sinal extracelular
fMOL	femtomole
FSH	hormônio folículo estimulante
FSHr	hormônio folículo estimulante recombinante
GC	guanilato ciclase
GMPc	guanosina 3´- 5´ monofostato cíclica
RVG	rompimento da vesícula germinativa
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
LH	hormônio luteinizante
mA	miliampere

MAPK	proteína cinase ativada por mitógenos
MAPKK	proteína cinase cinase ativada por mitógenos
MAPKKK	proteína cinase cinase cinase ativada por mitógenos
Na₂HCO₃	bicarbonato de Sódio
MET	transição materno embrionária
MIV	maturação <i>in vitro</i>
MPF	fator promotor de maturação
MI	metáfase I
MII	metáfase II
NaCl	cloreto de sódio
PBS	solução salina fosfatada livre de Ca ⁺ e Mg ⁺ acrescido de 0,1% de PVA
PDE	fosfodiesterase
PDEs	fosfodiesterases
PIV	produção <i>in vitro</i>
PIVE	produção <i>in vitro</i> de embriões
PKA	proteína cinase dependente de AMPc
PKG	proteína quinase estimulada pelo GMPc
pMAPK	proteína cinase ativada por mitógenos fosforilada
PVA	álcool polivilínico
PVDF	difluoreto de polivinilideno
PVP	polivinil pirrolidona
V	volts
VG	vesícula germinativa
1º CP	1º corpúsculo polar

LISTA DE UNIDADES E SÍMBOLOS

X	vezes
%	porcentagem
°C	graus Celsius
®	marca registrada
<	menor que
>	maior que
±	mais ou menos
+	mais/positivo
-	menos/negativo
=	igual
°	grau

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	16
2. HIPÓTESES E OBJETIVOS	19
2.1. HIPÓTESES	19
2.2 OBJETIVOS.....	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1. MATURAÇÃO OOCITÁRIA.....	22
3.1.1. <i>Maturação nuclear</i>	23
3.1.2. <i>Maturação citoplasmática</i>	24
3.1.3. <i>Maturação molecular</i>	25
3.2. CONTROLE DA MATURAÇÃO	26
3.2.1. <i>Nucleotídeos cíclicos</i>	26
3.2.1.1. <i>Adenosina 3´- 5´ Monofosfato Cíclica (AMPc)</i>	26
3.2.1.2. <i>Guanosina 3´- 5´ monofostato cíclica (GMPc)</i>	28
3.2.2. <i>Proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK)</i>	29
3.2.3. <i>Fosfodiesterases</i>	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. LOCAL DE EXECUÇÃO DO PROJETO.....	34
4.2. COLETA DOS OVÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DOS COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITOS	34
4.3. MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	35
4.4. DETERMINAÇÃO DO ESTÁDIO DA MEIOSE DO OÓCITO	35
4.5. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DOS NUCLEOTÍDEOS AMPc E GMPc	36
4.6. DETECÇÃO DA PROTEÍNA MAPK ATIVA (FOSFORILADA).....	37
4.7. AVALIAÇÃO DA TAXA DE BLASTOCISTO	38
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	41
5.1. EXPERIMENTO 1 – EFEITO DA INIBIÇÃO DE PDE3 E PDE8 NA RETOMADA DA MEIOSE E NÍVEIS DE AMPc DE OÓCITOS BOVINOS MATURADOS <i>IN VITRO</i>	41
5.2. EXPERIMENTO 2 – EFEITO DA INIBIÇÃO DE PDE5 ISOLADA OU EM ASSOCIAÇÃO AO INIBIDOR DA PDE3 OU PDE8 NA RETOMADA DA MEIOSE E NOS NÍVEIS DE GMPc E AMPc DE OÓCITOS BOVINOS MATURADOS <i>IN VITRO</i>	41
5.3. EXPERIMENTO 3 – EFEITO DA INIBIÇÃO DA PDE5 E PDE8 COM A ADIÇÃO DO FSH RECOMBINANTE NA RETOMADA DA MEIOSE E NÍVEIS DE AMPc DE OÓCITOS BOVINOS MATURADOS <i>IN VITRO</i>	42
5.4. EXPERIMENTO 4 – EFEITO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MATURAÇÃO NA RETOMADA DA MEIOSE, NA ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA CINASE ATIVADA POR MITÓGENOS E NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL DE OÓCITOS BOVINOS MATURADOS <i>IN VITRO</i> ...	43
6. RESULTADOS.....	46
6.1. EXPERIMENTO 1 – EFEITO DA INIBIÇÃO DE PDE3 E PDE8 NA RETOMADA DA MEIOSE E NÍVEIS DE AMPc DE OÓCITOS BOVINOS MATURADOS <i>IN VITRO</i>	46
6.1.1. <i>Retomada da meiose</i>	46
6.1.2. <i>Níveis de AMPc</i>	47

6.2. EXPERIMENTO 2 – EFEITO DA INIBIÇÃO DE PDE5 ISOLADA OU EM ASSOCIAÇÃO AO INIBIDOR DA PDE3 OU PDE8 NA RETOMADA DA MEIOSE E NOS NÍVEIS DE GMPc E AMPc DE OÓCITOS BOVINOS MATURADOS IN VITRO	49
6.2.1. <i>Retomada da meiose</i>	49
6.2.2. <i>Níveis de GMPc</i>	50
6.2.3. <i>Níveis do AMPc</i>	53
6.3. EXPERIMENTO 3 – EFEITO DA INIBIÇÃO DA PDE5 E PDE8 COM A ADIÇÃO DO FSH RECOMBINANTE NA RETOMADA DA MEIOSE E NÍVEIS DE AMPc DE OÓCITOS BOVINOS MATURADOS IN VITRO.....	55
6.3.1. <i>Retomada da meiose</i>	55
6.3.2. <i>Níveis do AMPc</i>	56
6.4. EXPERIMENTO 4 – EFEITO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MATURAÇÃO NA RETOMADA DA MEIOSE, NA ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA CINASE ATIVADA POR MITÓGENOS E NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL DE OÓCITOS BOVINOS MATURADOS IN VITRO...58	
6.4.1. <i>Retomada da meiose</i>	58
6.4.2. <i>Desenvolvimento embrionário após ativação partenogenética</i>	60
6.4.3. <i>Desenvolvimento embrionário após fertilização in vitro</i>	60
6.4.4. <i>Ativação da proteína MAPK em oócitos e células do cumulus</i>	61
6.4.4.1. <i>MAPK fosforilada nos oócitos</i>	61
6.4.4.2. <i>MAPK fosforilada nas células do cumulus</i>	62
7. DISCUSSÃO	65
8 CONCLUSÕES	78
9 REFERÊNCIAS.....	80
ANEXO A - PREPARAÇÃO DOS INIBIDORES.....	91

1 INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

Várias biotécnicas reprodutivas são utilizadas como ferramenta para o melhoramento genético do rebanho brasileiro visando aumentar a frequência de genótipos superiores (NINO-SOTO; BASRUR; KING, 2007).

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) visa recuperar os oócitos de animais geneticamente superiores, mas com distúrbios reprodutivos não transmissíveis geneticamente e também permite incrementar a utilização de uma mesma doadora de oócitos desde a pré-puberdade até a senilidade e nas primeiras horas *post-mortem*. Consiste também em uma importante ferramenta para a pesquisa relacionada à transgenia e clonagem e para o esclarecimento dos processos fisiológicos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário *in vivo*, além do aprimoramento da técnica *in vitro* e a estocagem de oócitos e embriões em bancos de germoplasma (SIMPLÍCIO; FREITAS; FONSECA, 2007; TRALDI, 2008).

No Brasil essa biotecnologia foi rapidamente incorporada ao setor produtivo, de tal forma, que no ano de 2007 já era responsável por 50% da produção de embriões *in vitro* do mundo (VIANA; CAMARGO, 2007).

O desenvolvimento do embrião é dependente do desenvolvimento do oócito do qual é originado (RODRIGUEZ; FARIN, 2004). Os índices de desenvolvimento de embriões viáveis ao final da produção *in vitro* passaram a obter melhores resultados com a seleção dos oócitos baseada na morfologia do complexo cumulus-oócito (CCO) e o aprimoramento dos meios e das condições de cultivo (MADISON; AVERY; GREVE, 1992; EPPIG; O'BRIEN, 1998).

Entretanto, apesar da melhora no sistema de produção e cultivo dos embriões *in vitro*, em torno de 60 a 70% dos oócitos que entram no sistema não chegam a atingir o estágio de blastocisto e a qualidade dos embriões obtidos sofre grande variação quando comparada à dos embriões produzidos *in vivo*.

A maturação *in vitro* (MIV) do oócito é um dos fatores limitantes na PIVE (RODRIGUEZ; FARIN, 2004; WANG; SUN, 2007). *In vivo*, esta maturação é um processo altamente orquestrado no qual a meiose é retomada após a onda de

gonadotropina que antecede a ovulação e que induz a queda dos níveis de AMPc no oócito. No entanto, os oócitos ao serem retirados dos folículos ovarianos retomam espontaneamente a maturação comprometendo a competência de seu desenvolvimento (BILODEAU-GOESEELS, 2007; GILCHRIST; ALBUZ; THOMPSON, 2009; MERMILLOD et al., 2000).

A retomada espontânea da maturação oocitária pode ser evitada pela suplementação do meio de cultivo com substâncias que mantêm elevados os níveis de AMPc. Essas substâncias podem ser: inibidores das fosfodiesterases (PDEs), análogos de AMPc ou ativadores da adenilato ciclase (RODRIGUEZ; FARIN, 2004). Além do AMPc, outro nucleotídeo cíclico (GMPc) também tem sido relacionado com a retomada da maturação (TÖRNELL; BRÄNNSTRÖM; HILLENSJÖ, 1984). Amenizar a retomada espontânea da meiose pode favorecer a qualidade da maturação do oócito e assim também melhorar sua competência para o desenvolvimento (ALBUZ, et al., 2010; LUCIANO, et al., 2011). A manipulação dos níveis de AMPc pode ser uma estratégia para controlar a retomada e desenvolver sistemas de cultivo mais apropriados.

A melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pela retomada da meiose em oócitos de mamíferos é crucial para desenvolver estratégias para melhorar a maturação *in vitro*, aumentando assim a eficiência das técnicas de reprodução assistida usadas para os animais domésticos, selvagens e aplicações clínicas em humanos (FARIN et al, 2007).

2 HIPÓTESES E OBJETIVOS

2. HIPÓTESES E OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESES

2.1.1. Diferentes isoformas de fosfodiesterases contribuem para o controle da meiose e dos níveis de AMPc no complexo cumulus-oócito de bovino.

2.1.2. O GMPc também influencia a retomada da meiose via alteração nos níveis de AMPc no complexo cumulus-oócito de bovino.

2.1.3. O sistema de cultivo de maturação induzida para manutenção de níveis mais elevados de AMPc nas primeiras horas de maturação melhoram a competência oocitária e alteram a ativação da MAPK em comparação com a maturação espontânea.

2.2 OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho desenvolvido foram de:

- 2.2.1. Determinar o efeito da inibição de diferentes isoformas de fosfodiesterases AMPc-específicas (PDE3 e PDE8) na retomada da meiose e nos níveis de AMPc.
- 2.2.2. Averiguar o efeito da inibição da isoforma de fosfodiesterase GMPc-específica (PDE5) na retomada da meiose e sua associação com inibidores de PDEs-AMPc-específicas (PDE3 e PDE8) na retomada da meiose e nos níveis de GMPc e AMPc.
- 2.2.3. Determinar o efeito de sistemas de maturação espontânea (sistema de MIV usual) e induzida (pré-MIV com agentes que elevam o AMPc seguida de MIV com FSHr e inibidores de PDEs) sobre a competência oocitária (maturação e desenvolvimento embrionário) e ativação da proteína MAPK.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

Os oócitos são as células animais mais extraordinárias, pois, após ativadas pelo espermatozóide podem dar origem a um novo indivíduo completo, dentro de dias, semanas ou meses/anos dependendo da espécie. Após a fecundação são capazes de originar todos os tipos celulares do organismo adulto, são altamente especializados e excepcionalmente equipados para a função única de gerar um novo indivíduo. O citoplasma de um oócito pode reprogramar o núcleo de uma célula somática para que esse possa dirigir o desenvolvimento de um novo indivíduo. Os oócitos contêm as reservas de todos os materiais necessários para o desenvolvimento inicial do embrião até o estágio no qual o novo indivíduo possa começar a sintetizar suas próprias proteínas (ALBERTS et al., 2010)

3.1. Maturação oocitária

O processo pelo qual o oócito completa a primeira divisão meiótica e progride até a metáfase II (MII) é chamado de maturação oocitária (MEHLMANN, 2005). Durante a vida intra-uterina, as células germinativas, logo após a colonizarem as gônadas, passam por diversas mitoses antes de iniciarem a meiose. Porém, pouco depois de iniciarem a meiose entram em um prolongado período de quiescência bloqueadas no estágio de diplóteno da prófase I (EPPIG, 1995; DEKEL, 1995; WANG et al, 2008). Acredita-se que esse bloqueio possa ser causado por diversos fatores inibitórios sintetizados pelas células da granulosa presentes no fluido folicular (HURK; ZHAO, 2005).

Segundo Bertagnolli et al. (2004) e Crocomo et al. (2011) durante o bloqueio meiótico, ocorrem modificações que incluem a síntese proteica, transcrição de RNAm e a reorganização de organelas que conferem ao oócito a capacidade de sustentar etapas posteriores do seu desenvolvimento.

Esse estágio é caracterizado pela presença de um núcleo distinguível designado morfológicamente como vesícula germinativa (VG) (EPPIG; O'BRIEN, 1995) e permanece dessa forma até a puberdade (HURK; ZHAO, 2005).

A maturação oocitária abrange duas etapas principais, a maturação nuclear e a citoplasmática. Essas, por sua vez, são etapas independentes, mas que interagem e, *in vivo*, ocorrem em determinados momentos simultaneamente, endossando a perfeita capacitação do oócito (CROCOMO et al., 2011; YAMADA; ISAJI, 2011).

3.1.1. Maturação nuclear

A maturação nuclear é observável morfológicamente pelo o rompimento da vesícula germinativa (RVG). Nesse estágio ocorre a dissolução da membrana nuclear e a condensação da cromatina. A correta condensação da cromatina é necessária para a obtenção total da capacidade meiótica (TAN et al., 2009).

Posteriormente, o oócito passa pelos demais estádios da meiose I: metáfase I, anáfase I e telófase I, completando essa fase da divisão meiótica com a formação do primeiro corpúsculo polar (CURCIO et al., 2006). Ao contrário do que ocorre na mitose, o processo de meiose passa para a segunda divisão sem a intérfase e replicação do DNA, e será novamente bloqueada na metáfase II, chamado de segundo bloqueio meiótico, até que ocorra a fertilização do oócito pelo espermatozoide (CONTI et al., 2002).

De acordo com Hyttel, Greve e Callesen (1989) a maturação nuclear *in vitro*, transcorre por um período que varia de 18 a 24 horas em bovinos. A RVG é o primeiro evento da maturação e ocorre entre as sete e 12 horas após o início do cultivo. A metáfase I irá ocorrer entre 12 e 15 horas, a anáfase I e telófase I entre as 15 e 18 horas e a prófase e metáfase II a partir das 18 horas. Entre 22 e 24 horas de cultivo, 95 % dos oócitos estão no segundo bloqueio meiótico (metáfase II).

In vivo, a retomada da meiose coincide com um aumento de três vezes nos níveis do FSH e com um aumento de oito vezes do hormônio luteinizante (LH) (HAUGHIAN et al., 2004; LI; ALBERTINI, 2013). Embora o LH seja considerado o principal agente para iniciar a maturação (TSAFRIRI et al., 1996), o FSH também parece exercer um papel importante nesse evento (FARIN et al., 2007).

O reinício da maturação nuclear *in vitro* acontece quando os CCOs são aspirados dos folículos ovarianos para procedimentos de cultivo. Com a retirada do ambiente folicular o CCO perde seu contato com as células foliculares e, como consequência da interrupção da transferência dos fatores inibidores da quebra da VG, ocorre a retomada “espontânea” da meiose (PINCUS; ENZMANN, 1935; EDWARDS, 1965). Essa retomada se dá independentemente do estágio de maturidade citoplasmática, comprometendo assim a competência de seu desenvolvimento (ALBUZ et al., 2010; BYSKOV et al., 1997; RICHARD, 2007). Segundo Thomas, Armstrong e Gilchrist (2004), a retomada espontânea da meiose ocorre antes do ooplasma adquirir os fatores e a maquinaria necessários para a maturação citoplasmática completa.

Os CCOs utilizados *in vitro*, são recuperados de pequenos folículos antrais que ainda não atingiram o desenvolvimento celular e molecular necessários para suportar a maturação e a fase inicial da embriogênese (GILCHRIST; THOMPSON, 2007). Com isso, passa a existir uma assincronia entre os processos de maturação nuclear e citoplasmática, resultando em menores taxas de desenvolvimento embrionário (BLODIN, et al., 1997; CROCOMO et al., 2011).

3.1.2. Maturação citoplasmática

A redistribuição das organelas citoplasmáticas, o estoque de RNAm, de energia e de proteínas são modificações necessárias para o processo de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário (FERREIRA et al., 2008; LI; ALBERTINI, 2013; SANDRI, 2007).

A maturação citoplasmática envolve modificações do citoesqueleto e moleculares que ocorrem no citoplasma do oócito em estágio de VG até o fim da meiose II (KRUIP et al., 1983). Essas modificações irão garantir ao oócito a competência de bloquear a polispermia, promover a descondensação da cabeça do espermatozoide e a formação do pronúcleo (HURK; ZHAO, 2005; YAMADA; ISAJI, 2011).

O processo de maturação citoplasmática pode ser dividido em três eventos principais como a redistribuição das organelas citoplasmáticas, a dinâmica dos filamentos do citoesqueleto e a maturação molecular (FERREIRA et al., 2008).

Ao longo da folículo-oogênese até próximo da retomada da maturação nuclear ocorre a formação das junções do tipo *gap* entre o oócito e suas células somáticas (LI; ALBERTINI, 2013), o desenvolvimento e deslocamento do complexo de Golgi para a periferia do oócito, a formação dos grânulos corticais e secreção das proteínas da zona pelúcida pelo complexo de Golgi, o desenvolvimento do retículo endoplasmático liso, a formação das gotas lipídicas, a diferenciação e aumento da quantidade de mitocôndrias, a formação e estoque de ribossomos, além da transcrição de RNAm e síntese de proteínas que são fundamentais para a progressão da maturação e do desenvolvimento embrionário inicial (CROCOMO et al., 2009; HYTTEL; GREVE; CALLESEN, 1997).

3.1.3. Maturação molecular

As mudanças nucleares devem ser sincronizadas com os numerosos eventos citoplasmáticos que acontecem durante a maturação oocitária (GANDOLFI; BREVINI, 2010).

Nos oócitos ocorrem mudanças dramáticas na expressão gênica, que são, porém, seletivas, para atender à demanda de armazenamento de organelas e macromoléculas que serão herdadas pelo embrião (PAN et al., 2005).

As mudanças moleculares também são necessárias para que os oócitos possam prosseguir pelo processo de maturação. Os mecanismos de controle molecular do desenvolvimento dos oócitos envolvem desde a seleção de oócitos primários destinados à maturação até a conclusão do ciclo de divisão meiótica e a ovulação e esses mecanismos parecem se diferenciarem de espécie para espécie, existindo diferentes caminhos para a regulação, como alterações nos níveis de AMPc, cálcio e fosforilações (HEIKINHEIMO; GIBBONS, 1998). A transcrição e o armazenamento de proteínas no citoplasma do oócito têm fundamental importância para a maturação e para assegurar o desenvolvimento embrionário inicial até o estágio de oito células, em bovinos, quando o genoma embrionário é ativado e a

síntese de novas proteínas torna-se necessária. Nessa fase, a expressão de certos genes irá determinar o sucesso da embriogênese no estagio pré-implantação (MEIRELLES et al., 2004).

A informação armazenada no oócito é particularmente crítica durante o intervalo entre a fertilização e a chamada transição materno-embrionária (MET), quando o genoma embrionário passa a ser funcional. Durante esse intervalo o desenvolvimento embrionário é suportado pela transcrição dos RNAm maternos e pelas proteínas que são sintetizadas na oogênese (GANDOLFI; BREVINI, 2010). A transcrição e estoque de RNAm ocorrem durante a folículo-oogênese, enquanto o núcleo celular se encontra em quiescência meiótica, e cessa quando ocorre a retomada da meiose, uma vez que os cromossomos se tornam condensados e “inativos”. Em contrapartida, a capacidade de tradução do RNAm e síntese proteica se mantém ao longo de todo desenvolvimento oocitário e embrionário (CROCOMO et al., 2009; GANDOLFI; GANDOLFI, 2001).

3.2. Controle da maturação

3.2.1. Nucleotídeos cíclicos

3.2.1.1. Adenosina 3' - 5' Monofosfato Cíclica (AMPc)

A regulação da meiose pelo AMPc, em mamíferos foi proposta originalmente por Cho e colaboradores em 1974 (DEKEL, 1995). O AMPc é um segundo mensageiro celular derivado da adenosina trifosfato (ATP) é sintetizado pela adenilato ciclase (AC) e tem uma meia-vida curta. Sua degradação ocorre no interior das células onde se formou pela ação das fosfodiesterases (PDEs) (RICHARD, 2007). Segundo Eppig, (1991), o AMPc pode ser produzido endogenamente nos oócitos.

Dentre os fatores necessários para que ocorra a retomada da meiose está a queda dos níveis de AMPc (SHIMADA; TERADA, 2002). Segundo Richard (2007), altos níveis de AMPc inibem a retomada da meiose nos oócitos. Porém, há uma

diferença na ação do AMPc entre as células foliculares e do oócito, onde um aumento do AMPc no folículo, mediada pela ação do LH, induz a maturação no oócito, enquanto que um aumento do AMPc intraoocitário inibe o processo (RICHARDS, 1980; TSAFRIRI et al., 1996). Níveis elevados de AMPc nas células do cumulus podem induzir a liberação de um ou mais sinais que desencadeiam a retomada da meiose, apesar da presença de níveis elevados no oócito (BILODEAU; FORTIER; SIRARD, 1993)

O AMPc pode ser transferido das células do cumulus para os oócitos através das junções do tipo *gap* (ANDERSON; ALBERTINI, 1976). A estimulação pelo LH ou a retirada do CCO do folículo (pela aspiração), causa uma interrupção da comunicação entre o CCO e as células foliculares, levando a uma diminuição do AMPc nos oócitos e conseqüentemente a retomada da meiose (DEKEL; GALIANI; SHERIZLY, 1988; CHEN et al, 2009).

Os CCOs bovinos, aparentemente, são bastante sensíveis a variações das concentrações intracelulares do AMPc, pois, um simples impedimento do rápido declínio do AMPc intracelular após a remoção do CCO do folículo até o reinício da meiose, já é o suficiente para um aumento na capacidade de desenvolvimento (GANDOLFI; BREVINI, 2010). Alguns estudos indicam que a magnitude da oscilação da concentração de AMPc tanto no oócito quanto nas células do cumulus, determina a progressão da maturação oocitária, e não necessariamente o nível absoluto de AMPc no interior destes tipos celulares (DOWNS; DUNN, 1995).

De acordo com Gandolfi e Brevini (2010) a maturação do oócito e a expansão das células do cumulus são desencadeadas por dois diferentes níveis de AMPc, de tal modo que os níveis de AMPc necessários para estimular o recomeço da meiose são menores do que o necessário para a expansão do cumulus.

A ativação da enzima adenilato ciclase promove aumento na concentração intracelular de AMPc, que interage e regula outras proteínas, como a proteína cinase dependente de AMPc (PKA) (CONTI et al, 2002). O bloqueio meiótico em oócitos é dependente de eventos de fosforilação catalisados pela PKA (MOCHLY-ROSEN, 1995).

O FSH é capaz de induzir a maturação do oócito *in vitro* (FU et al., 2007, ZHANG et al., 2007). Ao associar-se ao seu receptor nas células do cumulus, provoca inicialmente a elevação dos níveis de AMPc, ativando a PKA dos tipos I e II. A ativação da PKA tipo I mantém, num primeiro momento, o oócito em estágio de

VG com elevação dos níveis de AMPc. A ativação da PKA tipo II, porém, estimula um evento transcricional que resulta, posteriormente, na queda dos níveis de AMPc e consequentemente no RVG (RODRIGUEZ; FARIN, 2004, FARIN et al., 2007).

Bilodeau, Fortier e Sirard (1993) concluíram que a alta concentração de AMPc nas células do cumulus leva ao RVG, enquanto que no oócito, alta concentração de AMPc, leva a ativação da PKA do tipo I, mantendo o oócito sem retomar a meiose.

O fator promotor da maturação (MPF) é outro fator regulado pelo AMPc. (GOREN; DEKEL, 1994). Quando inativo é chamado de pré-MPF e para se tornar ativo é preciso que ocorra a desfosforilação nos resíduos de serina e treonina da sua subunidade catalítica (GAUTIER et al., 1998). O AMPc inibe a ativação do MPF (GOREN; DEKEL, 1994; DUCKWORTH; WEAVER; RUDERMAN, 2002). Segundo Josefsberg et al. (2003) essa inibição ocorre, pois, o AMPc previne a sua desfosforilação e também inibe a síntese de ciclina B, uma subunidade reguladora do MPF, com isso, diminuindo também o pré-MPF. Quando a PKA está ativa, ela fosforila o MPF, fazendo com que se torne inativo, assim impedindo a retomada da meiose (SIRARD; FIRST, 1998).

3.2.1.2. Guanosina 3' - 5' monofostato cíclica (GMPc)

Além do AMPc, outro nucleotídeo cíclico foi relacionado com o controle da meiose do oócitos, o GMPc. Sua síntese é controlada pela enzima guanilato ciclase (GC) e sua degradação realizada pelas PDEs, particularmente a PDE5 (BENDER; BEAVO, 2006; TÖRNELL; BILLIG; HILLENSJO, 1990).

Próximo à maturação ocorre uma queda nos níveis de GMPc nas células somáticas do ovário e essa queda pode ser causada pela indução do LH (HUBBARD; GREENWALD, 1982; RATNER, 1976; WANG et al., 2008). Nos oócitos também ocorre essa queda de GMPc próxima da retomada da maturação (TÖRNELL; BRÄNNSTRÖM; HILLENSJÖ, 1984).

Por outro lado, um aumento do GMPc nas células foliculares tem sido relacionado com um atraso da retomada da meiose sugerindo que o GMPc endógeno tem uma ação inibitória da retomada (HUBBARD; TERRANOVA, 1982;

TÖRNELL; BILLIG; HILLENSJO, 1990; TÖRNELL; BRÄNNSTRÖM; HILLENSJÖ, 1984).

Törnell, Billig e Hillensjo (1990) provaram que o AMPc e o GMPc diminuem ao mesmo tempo durante a retomada espontânea da meiose em ratos e que quando realizada uma microinjeção de GMPc exógeno, ocorre um atraso na retomada da meiose. Esses autores também mostraram que a queda do GMPc é observada na primeira hora da maturação espontânea.

De acordo com Hubbard e Terranova (1982) os derivados de GMPc tem um efeito inibitório na retomada espontânea da maturação nos oócito de camundongos e ratos. Wang et al. (2008) também demonstraram que a elevação do níveis de GMPc, pela via do óxido nítrico, inibe a maturação.

Segundo de La Fuente et al. (2001) pequenas elevações do GMPc induzidas pela inibição da PDE5 podem indiretamente aumentar a concentração de AMPc, pois ocorre inibição da PDE3 pelo GMPc.

3.2.2. Proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK)

A ativação da MAPK é um indicativo do processo molecular na maturação. As MAPKs são ativadas em resposta aos fatores de crescimento em vários tipos celulares (FISSORE; HÁ; VAN DE WOUDE, 1996). São proteínas serina-treonina cinases (DEKEL, 1995) e por serem ativadas por sinais extracelulares, os transmitem para o interior da célula, e são também conhecidas como cinases reguladas por sinal extracelular (ERK) (CROCOMO et al., 2009). As MAPK necessitam de duas fosforilações para se tornarem totalmente ativadas, uma no resíduo de treonina e outra na tirosina (RUDERMAN, 1993). As proteínas alvo das MAPKs são numerosas e variam de citosólica a nuclear e agem como ativadores transcricionais (SEGER; KREBS, 1995).

Elas participam no controle da meiose do oócito. A MAPK é inativa em VG, mas torna-se ativa com a retomada da meiose e assim se mantém até o final da maturação (MOTLIK et al., 1998). Estas proteínas agem no reinício e progressão da maturação nuclear, na reorganização dos microtúbulos e formação do fuso meiótico,

na manutenção do oócito em estágio de MII (segundo bloqueio) e na expansão das células cumulus (CROCOMO et al., 2009).

A MAPK está presente tanto no oócito, no qual é ativada pela proteína cinase MOS, quanto nas células do cumulus, nas quais é ativada pelas cinases Ras (SILVA, 2008). A indução da retomada da meiose pelo FSH requer a ativação da MAPK nas células do cumulus, ao contrário do que ocorre na maturação espontânea (ZHANG; ZHOU; WANG, 2007).

Segundo Sun et al. (2002), a ativação da MAPK nas células do cumulus depende dos fatores parácrinos secretados pelo oócito, o que demonstra a capacidade do oócito em controlar sua própria maturação meiótica (YAMADA; ISAJI, 2011).

Em bovinos, pouco antes da GVBD, ocorre simultaneamente a ativação do MPF e da MAPK. A ativação desta última aumenta progressivamente durante as 24 horas da maturação *in vitro* (WEHRENDE; MEINECKE, 2001), sendo que a atividade da MAPK aumenta gradualmente ao longo da maturação oocitária e se mantém alta até o estágio de MII (KAWAMURA, 2004). Níveis elevados de MAPK e MPF são necessários para manutenção dos oócitos no estágio de MII, sendo que a fertilização ou ativação partenogenética promove queda abrupta na concentração intraoocitária dessas duas cinases e conduz à conclusão da meiose (OH et al., 1998).

3.2.3. Fosfodiesterases

Cada tipo celular pode expressar diversos tipos de PDEs. Essas enzimas são os principais reguladores da concentração de AMPc e GMPc (BENDER; BEAVO, 2006). Segundo Chen et al. (2009) são essenciais para direcionar a retomada da meiose nos oócitos. A regulação diferencial de cada isoforma de PDE em diferentes compartimentos do complexo cumulus-oócito parece estar envolvida no controle dos níveis de AMPc e na maturação oocitária (LIANG et al., 2005).

Os 23 genes das PDEs são agrupados em 11 famílias de acordo com suas propriedades (CONTI; BEAVO, 2007; SASSEVILLE et al, 2009; WANG; SUN, 2007), sendo encontradas em várias isoformas. Essas isoformas possuem uma disposição

catalítica estrutural similar, porém, distinta quanto à regulação, conferindo características regulatórias distintas nas famílias das PDEs (KENAN et al., 2000)

As PDEs das famílias 3, 4, 8, 7 e 10 estão relacionadas à degradação apenas do AMPc. O GMPc é degradado pelas PDEs 5, 6 e 9 e as famílias 1, 2 e 11 podem degradar ambos nucleotídeos cíclicos (BENDER; BEAVO, 2006).

A PDE3A é a isoforma predominante presente nos oócitos (LIANG et al., 2005; SASSEVILLE et al., 2009; TSAFIRI et al., 1996). Quando mensurada a atividade da PDE presente nos oócitos, em diferentes tempos durante a maturação espontânea, mostrou-se que, próximo ao RVG há um aumento da atividade de PDE. Esse aumento foi bloqueado com inibidor específico da PDE3, indicando que essa isoformas de PDE está envolvida na regulação da retomada da meiose (RICHARD; TSAFRIRI; CONTI, 2001).

A inibição da PDE3 pode evitar a retomada espontânea da meiose nos oócitos *in vitro*. Estudos em ratas mostraram que uma disfunção genética da PDE3 levou à infertilidade, mostrando assim a importância dessa PDE na fisiologia ovariana (JIN et al., 1999; MASCIARELLI et al., 2004). Ainda em oócitos de ratas, observou-se que a inibição *in vitro* da PDE3A resultou no bloqueio da retomada da meiose induzida pelo LH (TSAFIRI et al., 1996).

Pode ocorrer ainda o chamado *cross-talk* entre as vias de GMPc e AMPc, quando as PDEs que degradam o AMPc são controladas pelos níveis de GMPc (KASS et al, 2007). Há evidências de que a degradação do AMPc é inibida pelo GMPc. Isso foi demonstrado inicialmente em plaquetas por Maurice e Haslam em 1990 e já se sabe que ocorre em todas as células que apresentam a PDE3 (BENDER; BEAVO, 2006).

A PDE5 é caracterizada pela sua especificidade pelo GMPc. Foi identificada e isolada primeiramente em plaquetas. Essa PDE foi conhecida pela sua ação regulatória no relaxamento da musculatura lisa e é o mais importante alvo do inibidor sildenafil (BENDER; BEAVO, 2006). A PDE5 também foi detectada em oócitos e células do cumulus de camundongos (WANG et al., 2008) e suínos (SASSEVILLE et al., 2008) e mais recentemente em bovinos (SCHWARZ et al., 2014).

A PDE5 parece estar diretamente envolvida no controle da maturação, interferindo com os níveis de GMPc e AMPc (WANG et al., 2008). Tais observações sugerem que o GMPc possa, dessa forma, participar no controle dos níveis de AMPc do oócito e/ou das células da granulosa.

Segundo Vaccari et al. (2009) a PDE5 foi identificada como o principal componente com atividade hidrolítica do GMPc em folículos pré-ovulatórios. Além disso, foi observado que quando há o aumento do GMPc devido à inibição da PDE5 pelo sildenafil ocorre um bloqueio meiótico reversível. As gonadotropinas também são capazes de aumentar a atividade de PDE5 em complexos cumulus-oócitos durante a maturação *in vitro* (SASSEVILLE et al., 2008).

Sasseville et al. (2009) foram os primeiros a caracterizar a presença e descrever o papel funcional da PDE8 no ovário de mamíferos, sendo essa a PDE predominante nas células do cumulus juntamente com baixos níveis de PDE4. Nas células da granulosa essas duas isoformas de PDE também foram encontradas, porém, a principal PDE nessas células é a PDE4 ocorrendo mudanças durante o crescimento folicular. A PDE8 é específica para hidrólise de AMPc (BENDER; BEAVO, 2006).

Tentativas de adiar a maturação nuclear bovina pela modulação específica das PDEs atrasam a ruptura das comunicações das junções do tipo *gap* entre as células do cumulus e o oócito e aumentam a produção e a qualidade de blastocistos (CONTI, 2002; CONTI et al., 2002; SASSEVILLE et al., 2009). Em ratos, camundongos e suínos os inibidores das PDEs, tanto específicos como os inespecíficos, possuem uma capacidade reversível de manter os oócitos *in vitro* bloqueados na meiose. Isto, porém, não acontece em bovinos, pois estes inibidores possuem apenas um efeito parcial na prevenção da retomada da meiose espontânea (AKTAS et al., 1995; BARRETO et al., 2007; SIRARD; FIRST, 1998; THOMAS; ARMSTRONG; GILCHRIST, 2002), sugerindo que talvez associações entre inibidores ou outras substâncias sejam necessárias para melhorar a capacidade dos inibidores em amenizar a retomada precoce da meiose espontânea durante a MIV.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

Nessa seção estão descritas as metodologias utilizadas nos quatro experimentos, bem como, o local, período experimental, coleta dos ovários, maturação dos CCOs e as avaliações realizadas.

4.1. Local de execução do projeto

As atividades experimentais foram realizadas no Laboratório de Histologia Animal localizado no Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), no *Campus* de Pirassununga-SP. O período experimental estendeu-se de novembro de 2012 a janeiro de 2014.

4.2. Coleta dos ovários para a obtenção dos complexos cumulus-oócitos

Os ovários bovinos foram obtidos em frigoríficos nas cidades de Ipuã - SP ou São Sebastião do Paraíso - MG. Foram coletados logo após o abate dos animais e armazenados, durante o transporte até o laboratório, em solução salina estéril (NaCl 0,9%) a uma temperatura de aproximadamente 30°C. Na chegada ao laboratório foram imediatamente lavados em solução salina igual a do transporte.

Para a obtenção dos CCOs apenas os folículos de 2 - 6 mm de diâmetro foram aspirados com uma agulha 18 G acoplada a uma seringa de 10 mL. O líquido folicular aspirado foi depositado lentamente em um tubo de centrifugação com fundo

cônico de 50 mL e mantido em repouso em um banho - seco a uma temperatura de 35°C por cinco a dez minutos para decantar.

Para busca e seleção dos CCOs, o líquido da porção superior do tubo cônico foi retirado e centrifugado a 1000G x 5 minutos e 5 mL desse líquido juntamente com 1 mL do sedimento foram transferidos para placas de Petri de 100 mm (Corning®, NY, USA). Os CCOs foram selecionados quanto à sua qualidade morfológica sob microscópio estereoscópico (NIKON® Co, Thailand). Para os experimentos, somente oócitos com três ou mais camadas de células do cumulus compactas e citoplasma uniforme foram utilizados.

Após a seleção os CCOs foram colocados em placas de Petri de 30 mm (Corning®, NY, USA) e lavados três vezes com o meio TCM199 (Sigma M2520) acrescido de 50µg/mL de gentamicina (Sigma G1397), 0,2 mM de piruvato (Sigma P5280) e 3mg/mL de PVP (Sigma 77627).

4.3. Maturação *in vitro*

Para a MIV, os CCO selecionados foram lavados no meio de maturação (TCM199 com 26 mM de Na₂HCO₃, 0,2mM de piruvato, 10µg/mL de gentamicina e 3mg/mL de PVP) e grupos de dez foram incubados em gotas de 50 µl de meio sob óleo mineral em placas de Petri de 60 mm (Corning®, NY, EUA). O cultivo foi realizado em estufa a 38,5°C, atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

4.4. Determinação do estágio da meiose do oócito

A técnica de coloração por orceína acética 1% foi utilizada para a determinação do estágio da meiose. Após a maturação *in vitro* os grupos de CCOs foram lavados três vezes em tampão fosfato salino (PBS livre de cálcio e magnésio) acrescido com 0,1% de PVA (Sigma P8136) e em seguida, foram desnudados nesse

mesmo tampão em tubos de ensaio de 5 mL (Falcon BD – 352054) no *vortex* por 5 minutos. Os oócitos foram lavados três vezes novamente e colocados entre lamina e lamínula para fixação em metanol e ácido acético (3:1) por no mínimo 24 horas. Após fixação os oócitos foram corados com orceína acética 1% e avaliados sob microscopia de contraste de fase (Zeiss, Germany). Os oócitos que continham vesícula germinativa foram considerados imaturos (VG). Oócitos sem a presença do envelope nuclear e em metáfase I foram agrupados e considerados como tendo retomado a meiose, passando pelo rompimento da vesícula germinativa (RVG). Oócitos com corpúsculo polar (metáfase II) foram considerados maturados.

4.5. Determinação dos níveis dos nucleotídeos AMPc e GMPc

A mensuração do AMPc e do GMPc foi realizada pelo método imunoensaio enzimático (EIA), com *pools* de 10 e 40 CCOs, respectivamente. Durante a seleção houve o cuidado para que o revestimento de células do cumulus em torno dos oócitos fosse de tamanhos similares (BILODEAU–GOESEELS, 2003).

Os CCOs foram lavados três vezes em PBS livre de cálcio e magnésio e transferidos para 200µL de 0,1N HCl. As células foram lisadas por 20 minutos e centrifugadas a 12.000G por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e armazenados a -20°C até serem submetidos aos ensaios de acordo com as instruções do kit (EIA AMPc e GMPc, Format A PLUS, Biomol).

Essa técnica foi realizada com a incubação das amostras com anticorpo primário presente nos poços das placas, junto com uma solução de fosfatase alcalina e um anticorpo secundário policlonal de coelho específico para AMPc ou GMPc. Após duas horas de incubação esses poços foram lavados com solução de lavagem do próprio kit e a eles foi adicionada uma solução de p-nitrofenil-fosfato por uma hora e em seguida foi adicionada a solução de parada.

A leitura foi feita por espectrofotometria em um filtro de 405nm e a mensuração realizada em duplicatas e para os cálculos foram subtraídos o valor do poço sem amostra (branco). Para chegar ao valor da concentração em femtomoles/mL, os valores das absorbâncias foram inseridos em uma função

logarítmica gerada pela curva-padrão que foi realizada com concentrações de AMPc ou GMPc conhecidas.

4.6. Detecção da proteína MAPK ativa (fosforilada)

Para essa análise, os CCOs foram separados e as amostras de *pools* de 30 oócitos e células do cumulus dos respectivos CCOs foram congelados a -20°C em 98 µl de tampão RPPA (150mM de NaCl, 1% ddeNp-40, 0,5% de deoxicolato de sódio, 0,1% SDS e 50mM Tris, pH 8,0) com 1 µl de protease e 1 µl de fosfatase. Anteriormente à aplicação das amostras no gel foi adicionado o corante da amostra (contendo 4% SDS, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,004%, β mercaptoetanol 10% e Tris-HCl 0,125M) e fervidas a 90°C por cinco minutos.

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de 12 % de poli(acrilamida-sódio duodecil sulfato) (SDS-PAGE), por aproximadamente uma hora e meia com o aparelho programado para 30 mA para cada gel. Posteriormente, foi feita a eletrotransferência, com uma solução de transferência NOVEX (Invitrogen® LC 3675) para uma membrana de PVDF por uma hora a 100V a temperatura de 4°C. Após a transferência a membrana foi lavada três vezes por cinco minutos em TBST (80g de NaCl, 2g de KCl, 30g de Tris Base e 2mL de Tween). Em seguida, foi bloqueada com a solução Superblock T20 (THERMO 37536) por uma hora sob leve agitação em temperatura ambiente. Ao encerrar o bloqueio foram realizadas três lavagens de cinco minutos em TBST e as membranas incubadas com o anticorpo primário anti- MAPK forforilada (pMAPK) diluído 1:1000 em TBST *overnight* na temperatura de 4°C.

Ao retirar as membranas do anticorpo primário foram lavadas cinco vezes por cinco minutos em TBST. Em seguida, as mesmas foram incubadas com o anticorpo secundário (cabra anti-IgG de coelho conjugada a peroxidase) diluída 1:3000 em TBST por uma hora em temperatura ambiente.

Ao retirar do anticorpo secundário, as membranas foram lavadas três vezes por cinco minutos e levadas em TBST para a revelação.

As membranas foram incubadas em reagente quimioluminescente Novex ECL (Invitrogen® - WP 20005) por cinco minutos e expostas a filme radiográfico por 5 minutos. As bandas presentes no filme foram analisadas pelo software ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) para densitometria das mesmas.

4.7. Avaliação da taxa de blastocisto

Para fecundação *in vitro* foi utilizado sêmen congelado de um mesmo touro e partida, separado por gradiente Percoll. Em um tubo eram colocados primeiramente 1 ml de Percoll 90% e sobre estes, 1 ml de Percoll 45%. A palheta de sêmen era descongelada a 37°C/30s, o sêmen colocado na porção superior do gradiente de Percoll e centrifugado a 700 G por 30 min. A concentração espermática no sedimento foi determinada e o sêmen diluído para obter-se uma concentração de $1,0 \times 10^6$ espermatozoides/mL. O meio para fecundação foi TALP suplementado com penicilamina (2 mM), hipotaurina (1 mM), epinefrina (25 mM) e heparina (10mg/ml), onde espermatozoides e oócitos foram incubados por 22 horas em estufa de CO₂. Após este período, os supostos zigotos foram lavados das células do cumulus e espermatozoides e a seguir, transferidos para gotas de cultivo sob óleo (100 µl de CR2 modificado suplementado com 2,5% de SFB) onde foram mantidos por 8 dias a 38,5°C em 5% CO₂ em ar.

4.8. Análise estatística

Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados utilizando o programa estatístico SAS (2002), com prévia verificação da normalidade dos resíduos e da homogeneidade das variâncias. Todas as variáveis dependentes que atenderam às premissas estatísticas de um teste paramétrico e foram comparados entre os tratamentos por ANOVA seguido de teste de Tukey para

comparação de médias (estádio da meiose, taxa de clivagem, blastocisto e ativação da proteína MAPK). As variáveis dependentes que não atenderam às premissas estatísticas (níveis de AMPc e GMPc) foram submetidas à transformação logarítmica $[(\text{Log}/x+1)]$. Os dados transformados foram submetidos à análise de variância, seguido pelo teste LSD para comparação das médias. Um nível máximo de 5% de significância foi admitido.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5.1. Experimento 1 – Efeito da inibição de PDE3 e PDE8 na retomada da meiose e níveis de AMPc de oócitos bovinos maturados *in vitro*

Para averiguar a influência da inibição da PDE3 e da PDE8 na retomada da meiose e nos níveis de AMPc, os CCOs foram maturados em quatro diferentes grupos de maturação:

- ✓ Controle: TCM199 acrescido com 26 mM de Na_2HCO_3 , 0,2mM de piruvato, 10µg/mL de gentamicina e 3mg/mL de PVP;
- ✓ Cilostamide: meio controle com a adição de 20µM de cilostamide (MAYES; SIRARD, 2002; LAFOREST, 2005; GILCHRIST et al., 2009).
- ✓ Dipiridamole: meio controle acrescido de 50µM de dipiridamole (SASSEVILLE et al., 2009)
- ✓ Cilostamide + dipiridamole: meio controle com a associação de 20µM de cilostamide com 50µM de dipiridamole.

Após nove horas de MIV os CCOs foram retirados para a determinação do estágio da meiose. Foram feitas seis repetições para essa avaliação.

Para a mensuração dos níveis de AMPc, os CCOs foram retirados de hora em hora durante as três primeiras horas de maturação. Seis repetições foram realizadas.

5.2. Experimento 2 – Efeito da inibição de PDE5 isolada ou em associação ao inibidor da PDE3 ou PDE8 na retomada da meiose e nos níveis de GMPc e AMPc de oócitos bovinos maturados *in vitro*

Nesse experimento, buscou-se averiguar a influência da inibição da PDE-GMPc específica (PDE5) e de sua associação com inibidores de diferentes

isoformas de PDEs-AMPc específicas (PDE3 e PDE8) na retomada da meiose e nos níveis de GMPc e AMPc.

Para tanto, os CCOs foram maturados em quatro diferentes meios de maturação:

- ✓ Controle: como já descrito;
- ✓ Sildenafil: adição de 10 μ M de sildenafil ao meio de cultivo (SASSEVILLE et al., 2008).
- ✓ Sildenafil + cilostamide: adição de 10 μ M de sildenafil e 20 μ M de cilostamide;
- ✓ Sildenafil + dipiridamole: associação de 10 μ M de sildenafil com 50 μ M de dipiridamole.

Após nove horas de MIV os CCOs foram retirados para a determinação do estágio da meiose. Foram feitas seis repetições para essa avaliação.

Para a mensuração dos níveis de GMPc e AMPc, os CCOs foram retirados de hora em hora durante as três primeiras horas de maturação. Cinco repetições independentes foram realizadas para cada nucleotídeo.

5.3. Experimento 3 – Efeito da inibição da PDE5 e PDE8 com a adição do FSH recombinante na retomada da meiose e níveis de AMPc de oócitos bovinos maturados *in vitro*

O objetivo desse experimento foi de determinar o efeito da associação do FSH, como estimulador da meiose, com inibidores de PDE-AMPc e/ou GMPc específicos na retomada da meiose e nos níveis de AMPc.

Nesse experimento os CCOs foram maturados em quatro diferentes meios de maturação:

- ✓ Controle: como já descrito;
- ✓ FSHr: adição de 0,5 μ g/mL de FSHr;
- ✓ Sildenafil + dipiridamole: associação de 10 μ M de sildenafil com 50 μ M de dipiridamole;
- ✓ Sildenafil + dipiridamole + FSHr: associação de 10 μ M de sildenafil com 50 μ M de dipiridamole e 0,5 μ g/mL de FSHr.

Após nove horas de MIV os CCOs foram retirados para a determinação do estágio da meiose. Foram feitas cinco repetições para essa avaliação.

Para a mensuração dos níveis de AMPc, os CCOs foram retirados de hora em hora durante as três primeiras horas de maturação. Cinco repetições foram realizadas.

5.4. Experimento 4 – Efeito de diferentes sistemas de maturação na retomada da meiose, na ativação da proteína cinase ativada por mitógenos e no desenvolvimento embrionário inicial de oócitos bovinos maturados *in vitro*

Nesse experimento visou-se comparar diferentes sistemas de maturação (espontânea x induzida) na retomada da meiose, nas taxas de desenvolvimento embrionário e na ativação da MAPK.

Para esse experimento foi realizada uma pré-maturação (Pré-MIV), seguida da maturação. A pré-MIV consistiu em cultivo *in vitro* com 500µM IBMX associado a 100µM forskolin por 2 horas (ALBUZ et al., 2011).

Foram constituídos os seguintes grupos:

- ✓ Controle (FSHr): meio MIV já descrito com 0,5µg/mL de FSHr (maturação espontânea) por 24 h;
- ✓ Pré-MIV (2 h) + MIV com cilostamida (20 µM) + FSHr por 22 h (maturação induzida; ALBUZ et al., 2010);
- ✓ Pré-MIV (2 h) + MIV com sildenafil + dipiridamole (10µM de sildenafil com 50µM de dipiridamole) + FSHr por 22 h;
- ✓ Sildenafil + dipiridamole + FSHr por 24 h: meio controle com a associação de 10µM de sildenafil com 50µM de dipiridamole.

Após 9, 24, 28 e 30 horas de MIV os CCOs foram retirados para a determinação do estágio da meiose. A avaliação às 9 horas foi realizada para determinar a retomada da meiose e das 24 às 30 horas para a progressão da meiose. Foram feitas três repetições para cada avaliação.

Para determinação do efeito sobre o desenvolvimento, os oócitos foram maturados por 22 (+ duas horas de pré-maturação) e 24 horas e posteriormente

submetidos à fecundação in vitro (FIV) e à ativação partenogenética, respectivamente (avaliações independentes; três repetições de cada).

Para determinar a ativação da MAPK, oócitos e células do cumulus foram avaliados nos diferentes tratamentos após 0, 3, 6 e 9 horas de MIV quanto à presença de MAPK fosforilada. Três repetições foram realizadas.

6 RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Experimento 1 – Efeito da inibição de PDE3 e PDE8 na retomada da meiose e níveis de AMPc de oócitos bovinos maturados *in vitro*

6.1.1. Retomada da meiose

Neste experimento avaliou-se o efeito da inibição da PDE3 e/ou PDE8 na proporção de oócitos bovinos que retomaram a meiose após nove horas de maturação *in vitro*. Os resultados obtidos podem ser observados na tabela 01. Os oócitos que permaneceram em VG foram considerados imaturos e os que romperam a vesícula germinativa (RVG) foram aqueles que retomaram a meiose, ou seja, iniciaram a maturação.

Tabela 01 – Proporção de oócitos bovinos em vesícula germinativa (VG) e que romperam a vesícula germinativa (RVG) (%) após nove horas de maturação *in vitro* na presença ou não de inibidores de PDE3 (cilostamide) e/ou PDE8 (dipiridamole).

Tratamentos	VG		RVG
	N (Oócitos)	N (média % $\pm$ EPM)	N (média % $\pm$ EPM)
Controle	55	13 (22,28 $\pm$ 5,03) ^b	42 (77,71 $\pm$ 5,03) ^a
Cilostamide	61	49(79,06 $\pm$ 6,89) ^a	12 (20,93 $\pm$ 6,89) ^b
Dipiridamole	66	21(25,10 $\pm$ 8,10) ^b	45 (74,89 $\pm$ 8,16) ^a
Cilo/Dipi	60	42(71,41 $\pm$ 9,69) ^a	18 (28,57 $\pm$ 9,69) ^b

^{a-b} Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$)
Resultados de seis repetições expressos em % $\pm$ erro padrão da média (EPM). Cilo/Dipi é a associação Cilostamide + Dipiridamole

Como se pode observar, após nove horas de MIV poucos oócitos do grupo controle (não tratado) ainda estavam imaturos (22,28% de VG), visto que a maior parte dos oócitos (77,71%) retomou a meiose. Ao contrário, a adição ao meio de maturação do inibidor da PDE3A (cilostamide) levou a um aumento ($p < 0,05$), da porcentagem de oócitos que permaneceram em VG (79,06%), com consequente

redução na proporção de oócitos que retomaram a meiose (21,93%) em relação ao controle ($p < 0,05$).

A adição do inibidor da PDE8 (dipiridamole) não afetou a retomada da meiose, visto que a proporção de oócitos imaturos (25,10%) e de oócitos de iniciaram a meiose (74,89%) foi similar ao observado no grupo controle ($p > 0,05$).

A associação de cilostamida e dipiridamole resultou em uma redução na proporção de oócitos que retomaram a meiose (28,57%), havendo mais oócitos permanecendo imaturos (71,41%) em comparação com o grupo controle e apenas com dipiridamole ($p < 0,05$). O efeito da associação foi semelhante à cilostamida isolada ($p > 0,05$), indicando que não houve um efeito adicional da associação dos dois inibidores e que o efeito observado foi dado apenas pela cilostamida, visto que a dipiridamole isolada foi similar ao grupo não tratado ($p > 0,05$) e a associação foi similar à cilostamida isolada ($p > 0,05$).

6.1.2. Níveis de AMPc

Os mesmos tratamentos foram também avaliados em relação aos níveis de AMPc, nas três primeiras horas de MIV. Os resultados estão apresentados nas figuras 01 e 02.

Figura 01 – Níveis de AMPc [fMol/CCO] de CCOs bovinos após 0, 1, 2 e 3 h de MIV nos grupos A) controle, B) cilostamide, C) dipiridamole e D) cilostamide + dipiridamole. Resultados de seis repetições. Não houve diferença estatística entre os diferentes tempos em nenhum dos grupos ($p > 0,05$).

Nos CCOs imaturos (zero hora de cultivo) os níveis de AMPc foram de 48,3 fMol/CCO. Ao longo do cultivo houve oscilações no AMPc em todos os grupos, mas não houve diferença ao longo do tempo, indicando uma estabilidade nos níveis do nucleotídeo de zero a três horas de MIV (figura 01). Os valores oscilaram de 45,8 a 178,4 ($p > 0,05$).

Figura 02 – Níveis de AMPc [fMol/CCO] de CCOs bovinos nos diferentes tratamentos (controle, cilostamide, dipiridamole e cilostamide + dipiridamole) às 1, 2 e 3 h de MIV. Resultados de seis repetições. Não houve diferença estatística entre os diferentes tratamentos em nenhum dos tempos de cultivo ($p > 0,05$).

Quando os diferentes tratamentos foram comparados entre si dentro de cada tempo (figura 02), também não foi observada nenhuma diferença entre eles ($p > 0,05$), indicando que nos tempos estudados, os inibidores não alteraram os níveis de AMPc, embora tenham tido efeito sobre as taxas de retomada da meiose.

6.2. Experimento 2 – Efeito da inibição de PDE5 isolada ou em associação ao inibidor da PDE3 ou PDE8 na retomada da meiose e nos níveis de GMPc e AMPc de oócitos bovinos maturados in vitro

6.2.1. Retomada da meiose

Para este experimento avaliou-se o efeito da inibição da PDE5 isoladamente ou em associação com o inibidor da PDE3 e PDE8 na proporção de oócitos bovinos

que retomaram a meiose após 9 horas de maturação *in vitro*. Os resultados obtidos podem ser observados na tabela 02.

Tabela 02 – Proporção de oócitos bovinos em vesícula germinativa (VG) e que romperam a vesícula germinativa (RVG) (%) após nove horas de maturação *in vitro* na presença de inibidores de PDE5 (sildenafil) e/ou PDE3 (cilostamida) e/ou PDE8 (dipiridamole).

Tratamentos	VG		RVG I
	N (Oócitos)	N (média % $\pm$ EPM)	N (média % $\pm$ EPM)
Controle	94	24(21,21 $\pm$ 5,03 ^b)	70 (78,78 $\pm$ 5,03 ^a)
Sildenafil	74	24(32,98 $\pm$ 6,29 ^{a, b})	50 (67,01 $\pm$ 6,29 ^{a, b})
Silde/Cilo	87	46(49,81 $\pm$ 9,04 ^a)	41 (50,18 $\pm$ 9,04 ^b)
Silde/Dipi	94	44(46,29 $\pm$ 9,42 ^a)	50 (53,70 $\pm$ 9,42 ^b)

^{a-b} Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Resultados de seis repetições expressos em % $\pm$ erro padrão da média (EPM). Silde/ Cilo é a associação Sildenafil + Cilostamida e Silde/Dipi é associação sildenafil + dipiridamole.

Após nove horas de MIV o grupo controle progrediu a maturação apresentando a maior parte dos oócitos já com a meiose retomada (78,78%) e apenas 21,21% ainda imaturos. O tratamento maturado apenas com sildenafil, não diferiu ($p > 0,05$) do controle, portanto, não atrasou a meiose, apresentando apenas 32,98% dos oócitos em VG.

A associação do sildenafil com o cilostamida e com o dipiridamole incrementou o efeito do sildenafil isolado e embora não tenham sido diferentes estatisticamente ($p > 0,05$) as associações aumentaram a proporção de imaturos (49,81 e 46,29%, respectivamente) em relação ao controle ($p < 0,05$). Paralelamente, as associações diminuíram ($p < 0,05$) os oócitos que retomaram a meiose em relação ao controle.

6.2.2. Níveis de GMPc

Esses mesmos tratamentos foram avaliados em relação aos níveis de GMPc, às 0, 1, 2 e 3 h de MIV. Os resultados estão apresentados nas figuras 03 a 06.

Figura 03 – Níveis de GMPc [fMol/CCO] de CCOs bovinos nos quatro grupos nos tempos: A) 0 e 1 hora, B) 0 e 2 horas, C) 0 e 3 horas. Resultados de cinco repetições. Diferenças estatísticas entre os tratamentos estão representadas em cada tempo de cultivo ($p < 0,05$). Sobre as barras indica diferença estatística em relação ao grupo imaturo (0 h) ($p < 0,05$).

Avaliando-se o perfil temporal dos tratamentos, observou-se que na primeira hora de maturação houve elevação ($p < 0,05$) do nível do GMPc em todos os grupos (193,90 a 936,08 fMol/CCO) em comparação com os CCOs imaturos (zero hora = 103 fMol/CCO). Após duas horas de MIV os níveis de GMPc decaíram no controle (100,21 fMol/CCO), retomando níveis similares ao imaturo ($p > 0,05$) e os tratamentos mantiveram os níveis acima do imaturo (146,53 a 870,45 fMol/CCO; $p < 0,05$). Já com três horas, todos os tratamentos foram similares ao grupo imaturo (26,42 a 38,26 fMol/CCO; $p > 0,05$). Desta forma, houve elevação do GMPc na primeira hora de MIV, com manutenção da elevação apenas nos tratamentos, e às três horas nenhum efeito foi mantido, ou seja, as variações nos níveis de GMPc se deram entre duas e três horas de MIV.

Comparando-se diretamente os tratamentos dentro de cada tempo, na primeira hora de MIV a associação sildenafil + dipiridamole obteve os níveis mais elevados (936,08 fMol/CCO; $p < 0,05$) em comparação com os demais (194,27; 193,90 e 381,37 fMol/CCO, para controle, sildenafil e sildenafil + cilostamide, respectivamente), que foram similares entre si ($p > 0,05$). Na segunda hora, o mesmo

padrão foi observado, onde controle, sildenafil e sildenafil + cilostamida (100,21, 146,53 e 186,98 fMol/CCO, respectivamente) não diferiram entre si ($p>0,05$) e novamente a associação sildenafil + dipiridamole apresentou os níveis mais altos (870,45, $p<0,05$) em relação aos demais grupos.

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($p<0,05$).

Figura 04 – Níveis de GMPc [fMol/CCO] de CCOs bovinos nos diferentes tratamentos (controle, sildenafil, sildenafil + cilostamida e sildenafil + dipiridamole) às 1, 2 e 3 h de MIV. Resultados de cinco repetições. Diferenças estatísticas entre os tratamentos estão representadas em cada tempo de cultivo ($p<0,05$).

Na terceira hora os grupos foram similares entre si (26,42 a 38,16 fMol/CCO, $p>0,05$) e embora a associação sildenafil + dipiridamole tenha se mantido mais elevada (165,86 fMol/CCO), não mais diferiu dos outros grupos ($p>0,05$).

Assim, pode-se dizer que o tratamento mais eficaz em manter os níveis de GMPc elevados por mais tempo nas primeiras horas de MIV foi a associação sildenafil + dipiridamole.

6.2.3. Níveis do AMPc

Nesse experimento os níveis de AMPc também foram avaliados nos diferentes tratamentos, às 0, 1, 2 e 3 h de MIV. Os resultados estão apresentados nas figuras 07 e 08.

Figura 05 – Níveis de AMPc [fMol/CCO] de CCOs bovinos após 0, 1, 2 e 3 h de MIV nos grupos A) controle, B) sildenafil, C) sildenafil + cilostamide e D) sildenafil + dipiridamole. Resultados de cinco repetições. * Indica diferença estatística entre os diferentes tempos em relação a zero hora ($p < 0,05$).

Ao longo do tempo, os níveis de AMPc apenas oscilaram nos diferentes tratamentos, não havendo diferenças significativas ($p > 0,05$) em nenhum deles, sugerido uma relativa estabilidade nos níveis desse nucleotídeo nas primeiras horas da MIV. A única exceção foi a elevação no grupos controle apenas às 2 h de MIV ($p < 0,05$), mas que depois retornou aos níveis iniciais com 3 h de cultivo ($p > 0,05$).

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Figura 06 – Níveis de AMPc [fMol/CCO] de CCOs bovinos nos diferentes tratamentos (controle, sildenafil, sildenafil + cilostamide e sildenafil + dipiridamole) às 1, 2 e 3 h de MIV. Resultados de cinco repetições. Diferenças estatísticas entre os tratamentos estão representadas em cada tempo de cultivo ($p < 0,05$).

Comparando-se os diferentes grupos dentro de cada horário de avaliação, com uma hora de maturação os grupos sildenafil e a associação sildenafil + dipiridamole (31,89 e 48,42 fMol/CCO respectivamente, $p > 0,05$) foram os grupos que diferiram do controle (22,75 fMol/CCO, $p < 0,05$), mantendo os níveis de AMPc mais elevados. A associação sildenafil + cilostamide e o controle foram similares entre si variando o nível de AMPc entre 21,49 a 22,75 fMol/CCO, respectivamente ($p > 0,05$).

Após duas horas de maturação apenas a associação sildenafil e cilostamide apresentaram níveis mais baixos de AMPc (9,45 fMol/CCO, $p < 0,05$) quando comparado ao controle (53,83 fMol/CCO) e ao sildenafil (50,62 fMol/CCO). Porém, foi similar a outra associação sildenafil + dipiridamole (15,60 fMol/CCO).

O nível de AMPc às três horas de maturação apresentou valores similares entre os grupos variando de 9,11 a 76,05 fMol/CCO ($p > 0,05$).

Assim, na primeira hora de MIV a associação sildenafil + dipiridamole teve o valor mais elevado, de forma similar ao observado para os níveis de GMPc. Essa diferença, porém, não se manteve nas horas seguintes.

6.3. EXPERIMENTO 3 – Efeito da inibição da PDE5 e PDE8 com a adição do FSH recombinante na retomada da meiose e níveis de AMPc de oócitos bovinos maturados *in vitro*

6.3.1. Retomada da meiose

Neste experimento avaliou-se o efeito da inibição da PDE5 e PDE8 com ou sem a adição do FSHr na proporção de oócitos bovinos que retomaram a meiose após nove horas de maturação *in vitro*. Os resultados obtidos podem ser observados na tabela 03.

Tabela 03 – Proporção de oócitos bovinos em vesícula germinativa (VG) e que romperam a vesícula germinativa (RVG) (%) após nove horas de maturação *in vitro* na presença de inibidores de PDE5 (sildenafil) e PDE8 (dipiridamole).

Tratamentos	VG		RVG
	N (Oócitos)	N (média % $\pm$ EPM)	N (média % $\pm$ EPM)
Controle	66	20 (30,56 $\pm$ 8,97 ^{b,c})	46 (69,45 $\pm$ 8,98 ^{a,b})
FSHr	120	18 (12,67 $\pm$ 4,41 ^c)	102 (87,32 $\pm$ 4,41 ^a)
Silde/Dipi	89	39 (43,11 $\pm$ 7,49 ^{a,b})	50 (56,88 $\pm$ 7,49 ^{b,c})
FSHr + Silde/Dipi	135	84 (67,32 $\pm$ 6,04 ^a)	51 (32,67 $\pm$ 6,04 ^c)

^{a-b} Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Resultados de seis repetições expressos em % $\pm$ erro padrão da média (EPM). Silde/Dipi é a associação sildenafil + dipiridamole e FSHr + Silde/Dipi é associação FSHr + Sildenafil/Dipiridamole.

O grupo maturado com o FSH foi o que obteve maior retomada da meiose (87,32%), porém, ainda foi similar ao controle sem hormônio (69,45%, $p > 0,05$). A associação sildenafil e dipiridamole reduziu um pouco mais a RVG (56,88%) em relação ao FSH ($p < 0,05$), mas a associação dos inibidores com FSH levou a uma queda ainda maior (32,67%, $p < 0,05$). De forma convergente, o grupo com FSHr e

sildenafil + dipiridamole foi o mais eficaz em manter oócitos em VG sendo superior (67,32%, $p<0,05$) ao maturado sem hormônios (30,56%) e com FSH (12,67%). A associação sem hormônios teve um valor intermediário de oócitos em VG (43,11%), sendo similar à associação com FSH e ao controle ($p>0,05$), mas ainda superior ao grupo com FSH ($P<0,05$). Interessante notar que FSH foi o que mais estimulou a RVG, mas quando associado aos inibidores, provocou maior inibição da RVG.

6.3.2. Níveis do AMPc

Os mesmos tratamentos foram também avaliados em relação aos níveis de AMPc, mas às 0, 1, 2 e 3 h de MIV. Os resultados estão apresentados nas figuras 09 e 10.

Figura 07 – Níveis de AMPc [fMol/CCO] de CCOs bovinos após 0, 1, 2 e 3 h de MIV nos grupos A) controle, B) FSHr, C) sildenafil + dipiridamole e D) FSHr + sildenafil/dipiridamole Resultados de seis repetições. * indica diferença estatística entre os diferentes tempos em relação a zero hora ($p<0,05$).

O padrão temporal mostrou que os tratamentos com presença de FSHr apresentaram elevação nos níveis de AMPc desde a primeira hora que se manteve até as três horas de MIV ($p < 0,05$), enquanto os grupos sem FSHr tiveram oscilações não significativas ($p > 0,05$) ao longo do tempo de cultivo, com estabilidade do nucleotídeo.

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Figura 08 – Níveis de AMPc [fMol/CCO] de CCOs bovinos nos diferentes tratamentos (controle, FSHr, sildenafil + dipirridamole e FSHr + sildenafil/dipiridamole) às 1, 2 e 3 h de MIV. Resultados de cinco repetições. Diferenças estatísticas entre os tratamentos estão representadas em cada tempo de cultivo ($p < 0,05$).

Comparando-se os grupos em cada tempo, na primeira hora de maturação os grupos com FSHr no meio de maturação elevaram consideravelmente o nível de AMPc ($p < 0,05$) em relação aos demais (18469,60 a 34818,10 fMol/CCO). Porém, o grupo com os inibidores associados e adição do FSHr foi o que obteve o nível mais elevado de AMPc (34818,10 fMol/CCO), sendo superior até ao grupo apenas com FSHr ($p < 0,05$).

Com duas horas de maturação o perfil foi similar ao de uma hora, ou seja, níveis mais elevados de AMPc na presença de FSHr, mas os grupos com FSHr já

não diferiram mais entre si (22953,68 e 22886,71 fMol/CCO, para FSHr e sildenafil + dipiridamole + FSHr, respectivamente, $p>0,05$). Estes continuaram superiores aos demais grupos (23,33 a 304,47 fMol/CCO, $p<0,05$).

Às três horas de maturação os grupos com FSHr, tanto o isolado como o com a associação, mantiveram os níveis de AMPc mais elevados (29017,01 e 22947,55 fMol/CCO, respectivamente, $p>0,05$) diferindo dos demais tratamentos (controle: 109,69 fMol/CCO e sildenafil + dipiridamole: 855,43 fMol/CCO) e do imaturo (23,33 fMol/CCO).

Nessas condições, a presença do FSHr com ou sem inibidores de PDEs elevou os níveis de AMPc nos CCOs nas primeiras horas da MIV, mas apenas na primeira hora a elevação foi mais intensa quando além do FSHr havia a associação dos inibidores de PDE5 (sildenafil) e dipiridamole (PDE8), mostrando um efeito adicional da associação.

6.4. EXPERIMENTO 4 – Efeito de diferentes sistemas de maturação na retomada da meiose, na ativação da proteína cinase ativada por mitógenos e no desenvolvimento embrionário inicial de oócitos bovinos maturados *in vitro*

6.4.1. Retomada da meiose

O quarto experimento avaliou o efeito de diferentes sistemas de maturação (espontânea = controle x induzida = tratamentos) na proporção de oócitos bovinos que retomaram a meiose após nove horas de maturação *in vitro*. Os resultados obtidos podem ser observados na tabela 04.

Tabela 04 – Proporção de oócitos bovinos em vesícula germinativa (VG) e que romperam a vesícula germinativa (RVG) (%) após nove horas de maturação *in vitro* com ou sem uma pré-maturação e uma maturação na presença de inibidores da PDE3 (cilostamide), PDE5 (sildenafil) e PDE8 (dipiridamole).

Tratamentos	VG		RVG
	N (Oócitos)	N (média % $\pm$ EPM)	N (média % $\pm$ EPM)
Controle	63	13(17,61 $\pm$ 6,33 ^b)	50(82,39 $\pm$ 6,33 ^a)
Silde/Dipi	45	31(75,77 $\pm$ 3,17 ^a)	14(24,22 $\pm$ 3,17 ^b)
Pré + Silde/Dipi	30	26(87,22 $\pm$ 8,94 ^a)	4(12,78 $\pm$ 8,94 ^b)
Pré + Cilo	51	38(65,13 $\pm$ 13,80 ^a)	13(34,86 $\pm$ 13,80 ^b)

^{a-b} Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Resultados de três repetições expressos em % $\pm$ erro padrão da média (EPM). Pré + Cilo é a associação pré – maturação + cilostamida; Pré + Silde/Dipi é a associação pré – maturação + sildenafil/dipiridamole e Silde/Dipi é sildenafil + dipiridamole.

Após nove horas de maturação todos os grupos tratados foram semelhantes entre si ($p > 0,05$), mantendo os oócitos em torno de 75% em VG, proporção esta superior ao controle que obteve apenas 17,61% dos oócitos em VG.

Tabela 05 – Proporção de oócitos bovinos em metáfase II (%) após 24, 28 e 30 horas de maturação *in vitro* com ou sem uma pré-maturação e uma maturação na presença de inibidores da PDE3 (cilostamida), PDE5 (sildenafil) e PDE8 (dipiridamole).

Tratamentos	Metáfase II			
	24 horas		28 horas	30 horas
	N Oócitos	N (média % $\pm$ EPM)	N (média % $\pm$ EPM)	N (média % $\pm$ EPM)
Controle	45	40(84,83 $\pm$ 4,13)	-	-
Silde/Dipi	160	48(80,92 $\pm$ 3,95)	34(71,76 $\pm$ 4,69)	37(67,60 $\pm$ 5,37)
Pré + Silde/Dipi	159	47(75,92 $\pm$ 3,71)	35(71,85 $\pm$ 12,85)	47(88,71 $\pm$ 1,03)
Pré + Cilo	164	45(81,45 $\pm$ 5,11)	47(87,16 $\pm$ 3,56)	37(72,48 $\pm$ 1,90)

Resultados de três repetições expressos em % $\pm$ erro padrão da média (EPM). Pré + Cilo é a associação pré – maturação + cilostamida; Pré + Silde/Dipi é a associação pré – maturação + sildenafil/dipiridamole e Silde/Dipi é sildenafil + dipiridamole.

Para os três horários de maturação (24, 28 e 30 horas) as variáveis estudadas não diferiram ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Às 24 horas tem torno de 80% dos oócitos estavam em MII. As 28 e 30 horas as taxas de MII foram de 68 a 89% ($p > 0,05$).

6.4.2. Desenvolvimento embrionário após ativação partenogenética

Tabela 06 – Proporção de oócitos bovinos clivados no dia dois de cultivo e blastocisto no dia sete de cultivo *in vitro* após a ativação partenogenética com ou sem pré-maturação e maturação *in vitro* na presença de inibidores da PDE3 (cilostamida), PDE5 (sildenafil) e PDE8 (dipiridamole).

Tratamentos	Clivagem		Blastocisto
	N (Oócitos)	N (média % $\pm$ EPM)	N (média % $\pm$ EPM)
Controle	111	79(70,13 $\pm$ 3,24)	43(38,98 $\pm$ 2,18 ^a)
Silde/Dipi	97	62(61,71 $\pm$ 7,09)	16(16,82 $\pm$ 1,23 ^b)
Pré + Silde/Dipi	105	73(68,71 $\pm$ 4,91)	16(16,21 $\pm$ 3,74 ^b)
Pré + Cilo	88	44(49,56 $\pm$ 2,78)	15(17,96 $\pm$ 3,33 ^b)

^{a-b} Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$) Resultados de três repetições expressos em % $\pm$ erro padrão da média (EPM)). Pré + Cilo é a associação pré – maturação + cilostamida; Pré + Silde/Dipi é a associação pré – maturação + sildenafil/dipiridamole e Silde/Dipi é sildenafil + dipiridamole.

A variável taxa de clivagem não diferiu ($p > 0,05$) nos quatro tratamentos estudados. Os grupos obtiveram em torno de 50 a 70% oócitos clivados.

A produção de blastocistos foi reduzida de forma similar em todos os grupos tratados (em torno de 16%, $p > 0,05$) em comparação com o controle (38%, $p < 0,05$).

6.4.3. Desenvolvimento embrionário após fertilização *in vitro*

Tabela 07 – Proporção de oócitos bovinos clivados no dia dois de cultivo e blastocisto no dia sete de cultivo após a fertilização *in vitro* com ou sem pré-maturação e maturação *in vitro* na presença de inibidores da PDE3 (cilostamida), PDE5 (sildenafil) e PDE8 (dipiridamole).

Tratamentos	Clivagem		Blastocisto
	N (Oócitos)	N (média % $\pm$ EPM)	N (média % $\pm$ EPM)
Controle	136	88(64,44 $\pm$ 4,21)	35(25,88 $\pm$ 4,04)
Silde/Dipi	135	79(58,55 $\pm$ 3,98)	35(25,88 $\pm$ 3,36)
Pré + Silde/Dipi	121	72(59,12 $\pm$ 6,00)	26(21,62 $\pm$ 4,08)
Pré + Cilo	135	83(61,33 $\pm$ 4,98)	37(27,22 $\pm$ 3,53)

Resultados de três repetições expressos em % $\pm$ erro padrão da média (EPM) Pré + Cilo é a associação pré – maturação + cilostamida; Pré + Silde/Dipi é a associação pré – maturação + sildenafil/dipiridamole e Silde/Dipi é sildenafil + dipiridamole.

Na fertilização *in vitro* as taxas de clivagem no segundo dia de cultivo foram semelhantes para todos os grupos estudados em torno de 60% de oócitos clivados. Após a realização de uma pré-maturação de duas horas e ou adição de inibidores ao meio de maturação a produção de blastocistos de 24% também não diferiu para nenhum grupo ($p>0,05$).

6.4.4. Ativação da proteína MAPK em oócitos e células do cumulus

6.4.4.1. MAPK fosforilada nos oócitos

Figura 10 – Densitometria da MAPK fosforilada (pixel) no oócito bovino após 0, 3, 6 e 9 horas de MIV nos grupos A) controle, B) Sildenafil+Dipiridamole, C) Pré-maturação + sildenafil/dipiridamole e D) Pré-maturação + cilostamide. Resultados de três repetições. * Indica diferença estatística entre os diferentes tempos em relação a zero hora ($p<0,05$).

Nos oócitos a MAPK fosforilada apresentou um perfil ascendente ao longo do tempo, sendo que o controle apenas diferiu do zero hora (imaturo) às seis horas ($p<0,05$).

A pré-maturação + sildenafil/dipiridamole teve um aumento da ativação da MAPK às três horas, em seguida uma diminuição às seis horas e novamente um aumento às nove horas de cultivo. O grupo com pré-maturação + cilostamide apresentou uma ativação mais lenta, diferiu apenas às nove horas ($p<0,05$).

O sildenafil + dipiridamole sem a pré-maturação diferiu ($p<0,05$) apenas às nove horas de cultivo.

6.4.4.2. MAPK fosforilada nas células do cumulus

Figura 12 – Densitometria da MAPK fosforilada (pixel) nas células do cumulus bovino após 0, 3, 6 e 9 horas de MIV nos grupos A) controle, B) Sildenafil+Dipiridamole, C) Pré-maturação + sildenafil/dipiridamole e D) Pré-maturação + cilostamide. Resultados de três repetições. * Indica diferença estatística entre os diferentes tempos em relação à zero hora ($p<0,05$).

O controle não teve diferença na ativação da MAPK fosforilada nas células do cumulus variando entre 20707,37 a 8314,03 ($p>0,05$). A associação do sildenafil com o dipiridamole diminuiu ativação às 9 horas (4385,76, $p<0,05$) em relação ao imaturo (20707,37). O mesmo ocorreu para os grupos que tiveram a pré-maturação ($p<0,05$). Observa-se que nas células do cumulus a situação é inversa ao oócito, com a redução da forma ativa ao longo do tempo. Os tratamentos acentuaram a redução da presença da MAPK na forma ativa.

7 DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Os inibidores eletivos das fosfodiesterases são ferramentas importantes no estudo dos oócitos e das células do cumulus para demonstrar as funções específicas das PDEs na regulação dos níveis de AMPc (THOMAS; ARMSTRONG; GILCHRIST, 2002).

Nesse estudo foi avaliada a influência das fosfodiesterases, com a utilização de inibidores específicos para diferentes isoformas durante a maturação *in vitro*, sobre a retomada da meiose, os níveis de GMPc e AMPc, no desenvolvimento embrionário e na ativação da proteína MAPK.

Os resultados apresentados nesse trabalho demonstram que os oócitos bovinos maturados com inibidores específicos das fosfodiesterases tiveram a progressão da maturação influenciada, levando a um atraso na retomada da meiose. Com a finalidade de retardar a maturação nuclear espontânea, a utilização de inibidores da PDE3 durante a MIV tem sido utilizada em diversas espécies como camundongos (MASCIARELLI et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2003), bovinos (THOMAS; ARMSTRONG; GILCHRIST, 2004), humanos (SHU et al., 2008; VANHOUTTE et al., 2007) e suínos (LAFOREST et al., 2005).

Quando avaliada a adição do inibidor da PDE3A (cilostamida) e da PDE8 (dipiridamole) isoladamente ou em associação, os resultados mostraram que a cilostamida aumenta a porcentagem dos oócitos em VG sugerindo que a inibição da PDE3A, isoforma predominante no oócito (TSAFRIRI et al., 1996), é a mais eficaz em bloquear a retomada da maturação.

Resultado semelhante aos observados neste estudo foi obtido por Thomas, Armstrong e Gilchrist (2002), comparando outro inibidor da PDE3 (milrinone) e da PDE4 (rolipran), sendo que apenas o inibidor da PDE3 foi capaz de atrasar a retomada espontânea da meiose em CCOs de bovinos. Ainda, Mayes e Sirard (2002), relatam que oócitos desnudos bovinos tratados com os inibidores de PDE3 milrinone e cilostamida mantiveram-se em estágio de VG (45 e 25%,

respectivamente) após 12 horas de MIV. Thomas, Armstrong e Gilchrist (2004) também obtiveram resultados similares utilizando o milrinone mostrando a eficiência da inibição da PDE3 em atrasar a retomada da meiose.

Albuz et al. (2010) também observaram um aumento da porcentagem de VG, aproximadamente 70%, às nove horas de maturação, utilizando o cilostamida, resultado esse, bastante semelhante ao do presente estudo (79% de VG/cilostamida). Bilodeau-Goeseels (2003) comparando outro inibidor específico da PDE3, o trenquisin com o rolipran (inibidor de PDE4) obteve um aumento da porcentagem de VG apenas nos CCOs bovinos tratados com o trenquisin, mostrando mais uma vez o papel fundamental da PDE3 na retomada da meiose. Shu et al. (2008) ao maturarem CCOs humanos também observaram um atraso na retomada da meiose utilizando cilostamida.

Uma observação interessante vista neste estudo foi de que os oócitos tratados com cilostamida que permaneceram em VG apresentavam em sua maioria uma cromatina descondensada, característico de um maior grau de imaturidade oocitária, indicando possivelmente, um bloqueio temporário da meiose mais próximo do fisiológico, ou seja, mais similar ao que se observa em oócitos recém-isolados do folículo ovariano. Esta descondensação também foi observada por Luciano et al., (2011), mesmo utilizando a metade da concentração de cilostamida (10 μ M) usada no presente experimento. É importante lembrar que a diferenciação da estrutura da cromatina durante os estádios de VG e RVG é um importante mecanismo epigenético para o controle da expressão de genes durante a oogênese, dando capacidade para os oócitos obterem sucesso no desenvolvimento embrionário (LUCIANO et al., 2011).

Sasseville et al. (2009) foram os primeiros a caracterizar e descrever o papel funcional da PDE8 no ovário de mamíferos, sendo as células do cumulus o local de maior expressão dessa isoforma. Considerando essa observação, investigou-se também a inibição dessa PDE nos CCOs de bovinos.

A adição do dipiridamole ao meio de maturação não foi capaz de inibir a progressão da meiose e ao associá-lo com o cilostamida não houve incremento no efeito do mesmo, indicando assim, que a isoforma PDE8, não parece contribuir para retardar a retomada da meiose nas condições de cultivo testadas. O único estudo utilizando esse inibidor em oócitos foi de Sasseville et al. (2009), porém seus resultados são contrários ao desse estudo, pois ao maturar os CCOs bovinos com dipiridamole

(50 μ M) às nove horas de maturação, obtiveram taxas mais elevadas de VG (aproximadamente 50%) o dobro do que foi observado nesse estudo (25%). As razões para contradição não são claras, visto que se utilizou a mesma concentração reportada por Sasseville et al (2009), mas outras variações nas condições laboratoriais, diferenças entre os animais doadores de ovários, possivelmente expliquem, ao menos em parte, essa diferença entre os resultados.

Embora seja amplamente aceito que a redução do AMPc é o sinal para a retomada meiose em mamíferos, os passos bioquímicos envolvidos nesse processo ainda não estão completamente definidos (VACCARI et al, 2009). Segundo Mayes e Sirard (2002), o nível total de AMPc encontrado no oócito depende do balanço entre a taxa da síntese pela adenilato ciclase (AC) e da taxa de degradação pelas PDEs. Nos bovinos, a atividade da adenilato ciclase está presente nas células do cumulus e nos oócitos e diferentes isoformas de PDEs também são encontradas nessas células (BENDER; BEAVO, 2006; SASSEVILLE et al., 2009; SCHWARZ et al., 2014).

Quando avaliados, nesse estudo, os efeitos dos inibidores da PDE3 e PDE8 isolados ou em associação em alterar os níveis de AMPc, esses não foram capazes de elevar os níveis do mesmo em relação ao controle não tratado. Embora a inibição da PDE3A devesse aumentar os níveis de AMPc e esse aumento retardar a retomada da meiose, observa-se que a meiose foi retardada mesmo sem a alteração dos níveis de AMPc, embora às duas horas de MIV o nível do AMPc de CCOs tratados com cilostamida tenha sido numericamente maior. Possivelmente a variabilidade nas mensurações tenha impedido a detecção de um efeito claro dos tratamentos, ou ainda, variações pequenas nos níveis de AMPc intraoocitário não detectáveis talvez já sejam capazes de provocar o atraso na meiose. Há também a possibilidade de que o tempo de maturação desse estudo não tenha sido o ideal para detectar essa variação.

Thomas, Armstrong e Gilchrist (2002), também observaram que os CCOs não aumentaram o nível de AMPc em relação ao controle ao utilizarem um inibir a PDE3A. O AMPc foi mensurado com cinco horas de cultivo e a técnica utilizada foi de radioimunoensaio, que é mais sensível que o imunoensaio enzimático utilizado no presente estudo. A possível explicação desse resultado poderia ser pelo fato das isoformas das PDEs serem compartimentalizadas nos folículos bovinos e fornecerem um mecanismo de regulação diferencial do AMPc ou ainda que a

inibição somente de PDE3 pode não ser suficiente para manter os níveis de AMPc intraocitário elevados, possivelmente devido a um nível insuficiente da atividade da adenilato ciclase endógena do oócito (THOMAS; ARMSTRONG; GILCHRIST, 2002).

Bilodeau, Fortier e Sirard (1993) ao utilizarem o inibidor inespecífico de PDEs (IBMX), também não observaram um aumento no nível de AMPc em CCOs de bovinos, às seis horas de maturação com a técnica de radioimunoensaio. Ao maturar os CCOs com IBMX por duas horas, Albuz et al. (2010) também não observaram aumento do AMPc.

Ao contrário do que foi relatado nesse estudo, Bilodeau-Goeseels (2003) observou um aumento do AMPc, ao inibir a PDE3 com trenquisin, essa mensuração foi realizada utilizando o mesmo método usado no presente experimento, porém foi realizada às seis horas de MIV. Foi sugerido, que o aumento do AMPc observado ocorreu nas células do cumulus, pois não houve aumento nos oócitos desnudos (BILODEAU-GOEESELS, 2003). Assim, parece que o efeito sobre o AMPc, embora reconhecido (níveis elevados bloqueiam a meiose e seu declínio induz a retomada), nem sempre é observável concomitante com efeitos sobre a maturação mediante o uso de inibidores de PDE3, havendo necessidade de se determinar o melhor inibidor e período de avaliação.

Em relação à inibição da PDE8 e seu efeito sobre o nível de AMPc, foi observado que não houve efeito, o que seria coerente com a ausência do atraso também sobre a retomada da meiose. Ao contrário das observações desse estudo, Sasseville et al., (2009) relataram um aumento do AMPc nos CCOs tratados com dipiridamole, às quatro horas de cultivo pela técnica de radioimunoensaio. Assim, os referidos autores relatam que o dipiridamole inibe a meiose (50% de VG às nove horas de MIV) e aumentam os níveis de AMPc, e no presente estudo não houve efeito nem na meiose (somente 25% de VG similar ao controle não tratado) e nem no AMPc, sugerindo que embora usado a mesma concentração da droga, outras diferenças no cultivo, como meio, tempo de avaliação, tenham levado a esses resultados.

Segundo Sasseville et al. (2009) inibidores das PDE3 e o IBMX podem manter o bloqueio meiótico em oócitos maturados *in vitro* de ratos, camundongos e suínos. Porém, esses inibidores têm uma eficiência parcial em inibir a retomada da meiose em bovinos, que seria explicada pela presença da PDE8 nas células do cumulus em bovinos, pois essa PDE tem uma afinidade maior ao AMPc que a

PDE4, também presente nessas células. A PDE8 pode induzir a hidrólise de um nível basal de AMPc e com isso contribuir para uma retomada da meiose mais rápida. No entanto, não se pode excluir a possibilidade que nas condições do presente estudo, além da inibição da PDE8 ter sido insuficiente, a PDE4 poderia estar hidrolisando parte do AMPc gerado pela inibição de PDE8 pelo dipiridamole.

De acordo com Thomas, Armstrong e Gilchrist (2002) os roedores são experimentalmente mais responsivos que os ungulados ao AMPc e seus análogos e também aos inibidores das PDEs, o que poderia explicar a variabilidade nos resultados descritos na literatura. Uma das possíveis explicações para isso seria que os ovários oriundos de abatedouros são extremamente heterogêneos em termos de qualidade e desenvolvimento, provavelmente pela mistura das idades, raças e status reprodutivo. Essa redução na eficácia do efeito dos inibidores das PDEs em bovinos quando comparado aos roedores pode estar relacionada a essa heterogeneidade típica dos estudos realizados em bovinos usando ovários coletados em abatedouros.

Recentemente a expressão da PDE5 foi detectada por Schwarz et al. (2014) em oócitos e células do cumulus de bovinos. Essa PDE é específica para a degradação do GMPc e como o mesmo também parece estar envolvido na retomada da meiose, o efeito de sua inibição com o sildenafil também foi avaliada em CCOs de bovinos.

A associação do inibidor da PDE5 com o inibidor da PDE3 ou da PDE8 poderia melhorar a eficiência em atrasar a retomada da meiose, pois os níveis de GMPc seriam elevados pela ação da inibição da PDE5 e os níveis de AMPc também seriam elevados pela inibição da PDE3, no oócito, ou PDE8 nas células do cumulus. Isso foi observado, pois os CCOs tratados com a associação de sildenafil + cilostamida e de sildenafil + dipiridamole tiveram maiores proporções em VG às nove horas de cultivo. Porém, esse atraso da meiose não foi observado no grupo tratado apenas com sildenafil, mostrando o mesmo encontrado por Vaccari et al. (2009) que não observaram diferença na taxa de RVG quando utilizado o sildenafil na maturação de oócitos de ratos. O contrário foi observado por Wang et al. (2008) ao inibirem CCOs de camundongos com sildenafil por quatro horas tiveram o RVG diminuído no grupo tratado.

Ao avaliar o nível de GMPc, a associação sildenafil + dipiridamole provocou sua elevação nas duas primeiras horas de cultivo. Esse aumento do GMPc contrasta com o que ocorre na maturação espontânea, onde se observa uma queda do GMPc

na primeira hora da maturação (TÖRNELL; BILLIG; HILLENSJO, 1990). Esse tratamento poderia então contribuir para amenizar a retomada espontânea da meiose e assim melhorar a maturação *in vitro* do oócito.

Schwarz et al. (2013) relataram elevação dos níveis de GMPc somente com o sildenafil em oócitos bovinos, porém a avaliação foi feita após 11 e 24 horas de maturação, mostrando portanto que o tempo de cultivo pode influenciar na avaliação dos resultados.

Wang et al. (2008) não detectaram elevação nos níveis de GMPc de oócitos desnudos e células do cumulus após 4 horas de MIV com o mesmo inibidor, utilizando camundongos como modelo experimental. Observa-se assim, que os efeitos dos inibidores de diferentes fosfodiesterases sobre níveis de nucleotídeos cíclicos são bastante variáveis, dependendo do modelo animal, associação com outros inibidores e tempo de cultivo requerendo mais estudos para determinar uma condição de cultivo ideal para o modelo bovino.

Considerando que há a possibilidade da PDE3A ser regulada pelo GMPc no oócito (RICHARD; TSAFRIRI; CONTI, 2001), também foi avaliada essa possibilidade. Em folículos de ratos cultivados com sildenafil, Vaccari et al. (2009) mostraram que a sinalização do GMPc e o AMPc são integradas e a regulação de ambos contribuem para o controle da não retomada da meiose pelo oócito. Informações sobre essa possibilidade em bovinos ainda são escassas.

No presente estudo pode-se observar que o tratamento com sildenafil + dipiridamole elevou os níveis de GMPc nas duas primeiras horas de cultivo, também manteve o nível de AMPc mais elevado na primeira hora de cultivo em relação ao controle não tratado. Considerando o conjunto dos dados, observa-se que a associação sildenafil + dipiridamole resultou em maior proporção de VG e níveis mais elevados de GMPc e AMPc nas primeiras horas de cultivo. Embora esse paralelismo não tenha sido mantido ao longo das três primeiras horas de cultivo, os efeitos observados entre uma e duas horas (AMPc e GMPc) tiveram consequências observáveis posteriormente em relação à retomada da meiose, ou seja, nas proporções de oócitos em RVG (9 horas), primeiro sinal morfológico da retomada da meiose.

Essas observações são também sugestivas da possibilidade de que a elevação de GMPc poderia, via sua capacidade de inibir a PDE3 do oócito, levar a um aumento nos níveis de AMPc, e com isso atrasar a retomada da meiose. Por

outro lado, tanto o aumento do GMPc como do AMPc pareceram ser mais intensos mediante a associação de inibidores, sugerindo que haveria necessidade de mais GMPc para que haja efetiva inibição da PDE3 e elevação suficiente de AMPc. Tal hipótese, porém, somente poderia ser cabalmente comprovada mediante um teste direto de inibição da PDE3 pelo GMPc em bovinos. Zaffalon et al. (2013) mensuraram a quantidade de GMPc que inibiria a atividade da PDE3A em suínos e foi observado que a quantidade necessária para essa inibição é de 300nM de GMPc. No presente experimento o nível máximo de GMPc encontrado foi no grupo com a associação do sildenafil + dipiridamole que foi aproximadamente 1000 fMol (1pMol), ou seja, valor muito abaixo para que ocorra a inibição da PDE3. Vaccari et al. (2009) ao realizar o mesmo estudo em ratos observaram que a quantidade necessária de GMPc para inibir a atividade da PDE3A é de 97nM. Em bovinos, esse valor ainda não foi determinado, mas obviamente há variações entre as espécies.

Ainda de acordo com Vaccari et al. (2009), o fato do LH causar uma queda de 80% do nível de GMPc em oócitos, o que leva a um aumento de 3 vezes da atividade da PDE3A, é um forte indicativo da ação dessa via sobre a retomada da meiose. Quando a PDE5 é injetada diretamente em oócitos desnudos de ratos, há uma indução da retomada da meiose, isso ocorre provavelmente pela diminuição do GMPc do oócito, resultando na ativação da PDE3A. Essa retomada não ocorre pela hidrólise direta do AMPc pela PDE5 pois é uma PDE específica de GMPc e também quando essa injeção ocorre em oócitos com deficiência da PDE3A não ocorre a retomada da meiose, indicando que a PDE3A é necessária para traduzir os efeitos de uma diminuição do GMPc intraoocitária. Essa possibilidade para oócitos bovinos, ainda que sugerida como possível diante dos resultados obtidos, ainda requer mais estudos para ser comprovada.

A capacidade do FSH de induzir a maturação do oócito *in vitro* (DOWNS, 1989; FU et al., 2007, ZHANG et al., 2007; CHEN et al., 2009) é consequência de sua associação ao seu receptor nas células do cumulus que, inicialmente provoca a elevação dos níveis de AMPc, ativando a proteína cinase dependente de AMPc (PKA) dos tipos I e II (RODRIGUEZ; FARIN, 2004).

A ativação da PKA pelo FSH, estimula a atividade da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) nas células do cumulus (FARIN et al., 2007; FISSORE; HE; VAN DE WOUDE, 1996; SU et al., 2001) e também no oócito (SU et al., 2002),

sendo essa ativação mais rápida nas células do cumulus. Já nos oócitos acontece próximo ao momento da quebra da VG (EBERLING; SHUON; MEINECKE, 2007).

O FSH também interfere nos níveis de GMPc, levando a um aumento de atividade da PDE3 e, conseqüentemente, a uma queda dos níveis de AMPc, estimulando a meiose em oócitos de hamster (HUBBARD; PRICE, 1988). Essa mediação da via do GMPc, pelas as ações do FSH, sobre os níveis de AMPc em oócitos bovinos ainda não foram totalmente determinadas.

Além disso, Bilodeau, Fortier e Sirard (1993) e Downs (1989) sugerem que o RVG é promovido por uma indução do FSH das células do cumulus. Isso foi observado no presente estudo, pois, o FSH provocou uma elevação na taxa de retomada da maturação às nove horas de cultivo. Por outro lado à associação sildenafil + dipiridamole elevaram a porcentagem de VG e com a adição do FSH ao meio obteve-se uma elevação adicional de proporção de oócitos imaturos.

Esses resultados são similares aos dados obtidos por Thomas, Armstrong e Gilchrist (2004), pois, associando o FSHr com um inibidor de outra PDE (inibidor de PDE3 -milrinone) no meio de maturação. Essa associação aumentou a proporção de VG às nove de cultivo, levando a um atraso do RVG em pelo menos 4 horas. Acredita-se que o fato do FSH estimular a produção de AMPc, em um primeiro momento, leve a um atraso na retomada da meiose. Isso ocorre, pois o FSH ativa a AC nas células do cumulus. Bilodeau, Fortier e Sirard (1993) também argumentam que o aumento do AMPc nas células do cumulus pode ativar um sinal estimulante para a maturação e esse sinal pode sobrepor o efeito inibitório dos altos níveis de AMPc intraoocitário.

No presente estudo observou-se que o grupo com FSH provocou elevação do AMPc nas três horas de MIV e também estimulou a meiose. Quando o FSH foi associado aos inibidores sildenafil + dipiridamole, houve uma elevação maior ainda do AMPc com uma hora de MIV. Essas observações corroboram os achados de Sasseville et al. (2009), que ao mensurarem o AMPc às 4 horas de cultivo de CCOs maturados com FSH e dipiridamole, os valores encontrados foram acima de mil femtomoles por CCOs, valores semelhantes ao desse estudo. No entanto, o aumento do AMPc nessa primeira hora provocou um retardo na retomada da meiose no grupo maturado nesse tratamento. Assim, indica-se que o AMPc ao ser elevado a um determinado nível ele aja de forma estimulatória na retomada da meiose, mas

acima disso possa agir de forma inibitória. Além disso, variações do AMPc somente até a primeira hora de MIV parece ser suficiente para afetar o controle da meiose.

De acordo com Rodriguez e Farin (2004) a maturação com a utilização do FSH no meio, é dependente de um evento inicial de transcrição que é mediada através das células do cumulus. Este evento é fundamental para o RVG e acredita-se que ocorrem nas primeiras uma a uma e meia horas de cultivo nos CCOs bovinos (KASTROP et al., 1991; FARIN; YANG, 1994; SIRARD et al., 1998).

Como já mencionado, quando os oócitos são aspirados dos folículos ovarianos para procedimentos de cultivo *in vitro*, estes retomam a maturação espontaneamente comprometendo a competência de seu desenvolvimento (ALBUZ et al., 2010). O bloqueio temporário da retomada da meiose foi sugerida como forma de amenizar a retomada espontânea da mesma, aumentando o tempo de contato entre o oócito e as células do cumulus pelas junções do tipo “gap”, melhorando a maturação (GILCHRIST, 2008).

Alguns estudos vêm sendo realizados na tentativa de amenizar a retomada espontânea da meiose, tentando desenvolver sistemas de MIV que sejam mais próximos do fisiológico. Albuz et al. (2010) desenvolveram uma maturação induzida elaborando um sistema de MIV que recapitula *in vitro* alguns dos sinais celulares inter e intra celulares que ocorrem no CCO *in vivo*, melhorando a qualidade da competência de desenvolvimento do oócito.

Para isso, a etapa fundamental, para o sucesso dessa técnica, é a pré-maturação de duas horas que gera um rápido aumento dos níveis de AMPc no CCO. Posteriormente é realizada a MIV com uma quantidade de FSH capaz de induzir a retomada da meiose mesmo na presença de um inibidor da PDE3 (cilostamida). O princípio do sistema é que altos níveis de AMPc e a indução da retomada são os sinais moleculares que acontecem na maturação *in vivo* (ALBUZ et al., 2010)

Nesse contexto, foi avaliado o sistema preconizado por Albuz et al. (2010) com uso de pré-MIV e MIV com FSH e cilostamida em comparação com o uso do FSH com a combinação de sildenafil + dipiridamole. Ao avaliar a taxa de retomada da meiose observou-se que com ou sem a pré-maturação os grupos tratados com sildenafil + dipiridamole tiveram a sua retomada atrasada, que foi tão eficaz quanto ao grupo com pré-maturação e tratado com cilostamida como utilizado por Albuz et al (2010). A pré-MIV com FSH e sildenafil + dipiridamole foi numericamente superior, mas não atingiu diferença estatística. Embora a retomada tenha sido retardada e

progressão não foi afetada às 24, 28 e 30 horas de cultivo. Esses resultados diferem do encontrado por Albuz et al. (2010) que observaram um retardo na progressão meiótica nos CCOs tratados com a pré-maturação e maturados com cilostamida. Embora tenham sido usados os mesmos tratamentos, tal diferença nos achados se deve provavelmente aos distintos meios de cultivo e origem dos animais nos diferentes estudos.

Como não houve esse retardo na progressão meiótica, para o desenvolvimento embrionário foi utilizada MIV usual de 24 horas. Após ativação partenogenética ou fertilização *in vitro* observou-se que os tratamentos reduziram a proporção de blastocistos no primeiro caso, mas não no segundo. Assim, diferentes sistemas de avaliação do potencial de desenvolvimento embrionário dos oócitos, se comportam de forma diferente (partenogênese x FIV), devendo ser avaliados de acordo com o destino dos oócitos (por exemplo, ativação partenogenética é utilizada para estudos de clonagem).

Segundo Lonergan (2007) a taxa de blastocisto em bovino (FIV) é de 25-35% raramente excede 40%, taxas semelhantes foram encontradas nesse trabalho em todos os tratamentos.

Tanto os resultados das taxas de clivagem como de blastocisto, na FIV, foram contrários ao encontrado por Albuz et al. (2010) que conseguiram um aumento na taxa de clivagem nos CCOs com pré-maturação e cilostamida quando inseminados às 30 horas de cultivo. A taxa de blastocisto também foi elevada nos CCOs tratados e inseminados tanto às 24 e 30 horas. Não há até o momento, nenhum outro trabalho que tenha avaliado essa técnica, sendo difícil uma comparação. De toda forma, embora os tratamentos tenham sido similares, há algumas diferenças nas condições de cultivo e de animais que podem ter contribuído para resultados distintos. Nem o uso do cilostamida (ALBUZ et al., 2010) e nem o uso de sildenafil + dipiridamole após a pré-maturação foram eficientes para uma maturação induzida com melhorias no desenvolvimento embrionário posterior.

O FSH não só induz a maturação nuclear *in vitro* (EPPIG, 1991) e a expansão do cumulus (CALDER et al., 2003; CHIAN et al., 1999; SINGH; BARBE; ARMSTRONG, 1993), mas também melhora maturação citoplasmática (IZADYAR; ZEINSTRA; CALLESEN, 1998) e o desenvolvimento embrionário (ATEF et al., 2005). Thomas, Armstrong e Gilchrist (2004) ao utilizarem os inibidores da PDE3 e PDE4 (milrinone e rolipram) acrescidos com FSH conseguiram um aumento na taxa

de blastocisto, nos CCOs maturados por 28 horas. Relataram também que a inibição de PDEs que hidrolisam o AMPc durante a maturação do oócito e melhora o seu potencial de desenvolvimento, demonstrado pelo aumento da produção de blastocistos. Embora não tenha havido diferença entre os grupos em relação aos tempos de MIV nesses tratamentos para realizar a FIV no presente trabalho, os estudos de Thomas, Armstrong e Gilchrist (2004) e Albuz et al. (2010) usaram tempos de maturação mais longos, sendo portanto interessante avaliar a extensão no tempo de MIV nos tratamentos testados visando contribuir na melhoria dos resultados de desenvolvimento.

Nesse estudo também foi avaliada a ativação da MAPK. Em ratos (VERLHAC, 1994) a ativação da MAPK ocorre um pouco após o RVG o que demonstra que a MAPK não está envolvida com as etapas iniciais da maturação. Porém, Fissore, He e Van De Woude (1996) sugerem que em bovinos a MAPK é essencial para o início da retomada com base no tempo da ativação.

Neste trabalho a avaliação da ativação da MAPK nos oócitos foi de forma crescente durante a maturação. O controle teve o maior pico de ativação às seis horas corroborando os dados de Fissore, He e Van De Woude (1996) onde a MAPK teve sua atividade baixa até seis horas de maturação e aumentou progressivamente até às 15 horas de cultivo e esse perfil segue o RVG, sugerindo a necessidade da ativação dessa cinase para a maturação.

Já os CCOs tratados com a pré-maturação e maturados com cilostamide ativaram a MAPK de forma um pouco mais lenta nos oócitos (nove horas), ao contrário dos grupos maturados com sildenafil + dipiridamole com pré-maturação que ativaram a MAPK de forma mais rápida (três horas, mas com oscilação às seis horas e aumento novamente às nove horas). Esses dados sugerem que os inibidores de PDE podem ter efeitos sobre a atividade da MAPK, porém, mais estudos precisam ser realizados para elucidar melhor esses efeitos, pois esse foi o primeiro estudo relacionando a ativação da MAPK e inibidores de PDEs.

Liang et al. (2005) sugerem que a ativação da MAPK, nos oócitos, não é necessária para a retomada da meiose, porém a ativação da cascata da MAPK, nas células do cumulus, é indispensável para a retomada da meiose através da indução das gonadotropinas. Desta forma, a ativação da MAPK nas células do cumulus também foi avaliada no presente estudo, e o resultado foi contrário ao dos oócitos, onde a MAPK já está ativa no início da maturação e com o passar do tempo vai se

reduzindo. Além disso, os tratamentos acentuaram a queda na MAPK ativa que foi mais intensa que no controle. Desta forma, os tratamentos sobre as PDEs também podem influenciar a dinâmica da atividade de MAPK também nas células do cumulus.

Su et al. (2002) relataram que a MAPK nas células do cumulus de ratos é ativada antes do RVG e essa ativação ocorre pela ação de gonadotropinas, mostrando que a ativação da MAPK é responsável pela expansão das células do cumulus, pois, quando realizado o bloqueio da ativação da MAPK nas células do cumulus não ocorreu a expansão. Desta forma, é importante avaliar os efeitos de diferentes tratamentos também sobre essas células dada a sua influência na retomada da meiose dos oócitos.

Albuz et al. (2010) relatam que eventos que se dão entre uma e duas horas após a colheita dos CCOs tem profundas consequências no desenvolvimento do oócito. Embora os resultados obtidos no presente experimento tenham sido diferentes em termos de desenvolvimento embrionário, mostram que a manipulação dos níveis de nucleotídeos e das PDEs nas horas iniciais de maturação tem importantes efeitos sobre a retomada da meiose observada horas depois do início do cultivo da maturação.

8 CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

1. A isoforma da fosfodiesterase 3 contribui para o atraso da meiose, porém, não altera os níveis de AMPc no complexo cumulus - oócito de bovino.
2. A inibição da PDE–GMPc específica quando associada com aos inibidores da PDE3 ou PDE8 também influenciam na retomada da meiose e elevam os níveis de GMPc e AMPc nas primeiras horas de maturação no complexo cumulus - oócito de bovino.
3. O sistema de cultivo de maturação induzida para manutenção de níveis mais elevados de AMPc nas primeiras horas de maturação não melhoram a competência oocitária e pouco afetam a ativação da MAPK em comparação com a maturação espontânea.

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

AKTAS, H. et al. Maintenance of bovine oocytes in prophase of meiosis I by high [cAMP]. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 105, p. 227-235, 1995.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da células**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALBUZ, F. K. et al. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction**, v. 25, n. 12, p. 2999–3011, 2010.

ANDERSON, E.; ALBERTINI, D. F. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. **Journal of Cell Biology**, v.71, n. 2, p. 680-686, 1976.

ATEF, A.; FRANÇOIS, P.; CHRISTIAN, V.; MARC-ANDRÉ, S. The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, n. 3, p. 358-367, 2005.

BARRETO, L.S. et al. Role of roscovitine and IBMX on kinetics of nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 202-207, 2007.

BERTAGNOLLI, A. C. et al. Interação entre células do cumulus e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, p. 488-496, 2004.

BENDER, A. T.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 488-520, 2006.

BILODEAU, S.; FORTIER, M. A.; SIRARD, M. A. Effect of adenylate cyclase stimulation on meiotic resumption and cyclic amp content of zona-free and cumulus-enclosed bovine oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 5-11, 1993.

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/cyclic GMP pathway on bovine oocyte meiotic resumption in vitro. **Theriogenology**, v. 68, p. 693–701, 2007.

BILOUDEAU-GOESEELS, S. Cows are not mice: the role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the

maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, n. 10-11, p. 734-743, 2011.

BLONDIN P. et al.. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, v. 47, p. 1061-1075, 1997.

BYSKOV, A. G.; ANDERSEN, C. Y.; HOSSAINI, A.; GUOLIANG, X. Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulated with FSH. **Molecular reproduction and Development**, v. 46, n. 3, p. 296-305, 1997.

CALDER, M. D., CAVENEY, A. N., SMITH, L. C., WATSON, A. J. 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. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 14 –25, 2003.

CHEN, J.; CHI, M. M.; MOLEY, K. H. DOWNS, S.M. cAMP pulsing of denuded mouse oocytes increases meiotic resumption via activation of AMP-activated protein kinase. **Reproduction**, v. 138, p. 759-770, 2009.

CHIAN, R. C., et al. Production of steroids from human cumulus cells treated with different concentrations of gonadotropins during culture in vitro. **Fertility and Sterility**, v. 71, p. 61-66, 1999.

CONTI, M. et al. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, p. 153-159, 2002.

CONTI, M. Specificity of the cyclic adenosine 3'5' monophosphate signal in granulosa cell function. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1653-1661, 2002.

CONTI, M.; BEAVO, J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. **Annu Rev Biochem**, v. 76, p. 481-511, 2007.

CROCOMO, L. F. et al. Aspectos bioquímicos e ultraestruturais da maturação oocitária. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 4, p. 542-552, 2011.

CURCIO, B. R.; et al. Equinos: oogênese, foliculogênese e maturação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, p. 28-35, 2006.

DEKEL, N.; GALIANI, D.; SHERIZLY, I. Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes. **Molecular Cell Endocrinology**, v. 56, n. 1-2, p. 115-121, 1988.

DEKEL, N. Molecular control of meiosis. **Trends in Endocrinology and metabolism**, v. 6, n. 5, p. 165-169, 1995.

DOWNS, S. M. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 41, p. 371-379, 1989.

DOWNS, S. M.; DUNN, H. M. Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte-cumulus cell complex by site-selective analogs of cyclic adenosine monophosphate. *Developmental Biology*, v. 172, p. 72-85, 1995.

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

EBERLING, S.; SHUON, C.; MEINECKE, B. Mitogen-activated protein kinase phosphorylation patterns in pig oocytes and cumulus cells during gonadotrophin-induced resumption of meiosis *in vitro*. *Zygote*, v.15, p.139-147, 2007.

EDWARDS, R. G. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, v. 208, p. 349-351, 1965.

EPPIG, J. J. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays*, v. 13, p. 569–574, 1991.

EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M. J. *In vitro* maturation and fertilization of oocytes isolated from aged mice: a strategy to rescue valuable genetic resources. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 12, n. 4, p. 269-273, 1995.

EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M. J. Comparison of pre implantation developmental competence after mouse oocyte growth and development *in vitro* and *in vivo*. *Theriogenology*, Los Altos, v. 15, n.49, p.415-422, 1998.

FAN, H. Y.; SUN, Q. Y. Minireview: involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*, v. 70, p. 535-547, 2004.

FARIN, C. E.; YANG, L. Inhibition of germinal vesicle breakdown in bovine oocytes by 5,6-dichloro-1-B-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB). *Molecular Reproduction and Development*, v. 37, p. 284-292, 1994.

FARIN C. E., et al. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, v.98, n. 1-2, p. 97-112, 2007.

FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, v. 71, p. 836-848, 2008.

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

- 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.
- GANDOLFI, F.; BREVINI, T. A. L. *In vitro* maturation of farm animal oocytes: a useful tool for investigating the mechanisms leading to full-term development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 495-507, 2010.
- GANDOLFI, B. T. A. L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology** v. 55, p. 1255-1276, 2001.
- GAUTIER, J.; NORBURY, C.; LOHKA, M.; NURSE. P. MALLER, J. Purified maturation promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. **Cell**, v. 54, p. 433-439, 1988.
- GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, v. 67, p. 6-15, 2007.
- GILCHRIST, R. B., LANE, M. THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 2. p. 159–177, 2008.
- GILCHRIST, R. B., ALBUZ, F. K.; THOMPSON, J. G. A new approach to *in vitro* maturation (ivm) and embryo *in vitro* production: induced ivm substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Reprod. Fertil. Dev.** v. 22, p. 293–293, 2009.
- GOREN, S.; DEKEL, N. Maintenance of meiotic arrest by a phosphorylated $p34^{cdc2}$ is independent of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 956-962, 1994.
- HAUGHIAN J. M.; GINTHER O. J.; KOT K.; WILTBANK M. C. 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.
- HEIKINHEIMO, O.; GIBBONS, W. E. The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. **Molecular Human reproduction**, v. 4, p. 745-756, 1998.
- HUBBARD, C. J.; GREENWALD, G. S. Cyclic nucleotides, DNA, and steroid levels in ovarian follicles and corpora lutea of the cyclic hamster. **Biology of reproduction**, v. 26, n. 2, p. 230-240, 1982.
- HUBBARD, C. J.; TERRANOVA, P. F. Inhibitory action of cyclic guanosine 5'-phosphoric acid (GMP) on oocyte maturation: dependence on an intact cumulus. **Biology of Reproduction**, v. 26, n. 4, p. 628-632, 1982.

- HUBBARD, C. J.; PRICE, J. The effects of follicle stimulating hormone and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate on cyclic adenosine 3', 5'-monophosphatophosphodiesterase and resumption of meiosis in hamster cumulus-oocyte complexes. **Biology of Reproduction**, v.39, p.829-838, 1988.
- HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, V. 63, N. 6, P. 1717-1751, 2005.
- HYTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocytes maturation and fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 38, p. 35-47, 1989.
- 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. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, n. 3, p. 339-345, 1998.
- JIN, S. L. et al. Impaired growth and fertility of cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci**, v. 96, p. 11998-12003, 1999.
- JOSEFSBERG, L. B. Y. Maturation-Promoting Factor Governs Mitogen-Activated Protein Kinase Activation and Interphase Suppression During Meiosis of Rat Oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1282-1290, 2003.
- KASS, D. A.; TAKIMOTO, E.; NAGAYAMA, T.; CHAMPION, H. C. Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling. **Cardiovascular Research**, v.75, p. 303-314, 2007.
- KASTROP, P. M. et al. The effects of alpha-amanitin and cycloheximide on nuclear progression, protein synthesis, and phosphorylation during bovine oocyte maturation in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 28, p. 249-254, 1991.
- KAWAMURA, K. et al. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. **PNAS**, v. 101, p. 7323-7328, 2004.
- KENAN, Y. et al. Functions of the N-terminal region of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 (PDE 3) isoforms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 12331-12338, 2000.
- KRUIP, T. A. M. et al. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. **Molecular Reproduction and Development**, v. 8, n. 1, p. 29-47, 1983.
- LA FUENTE, J. et al. A família das fosfodiesterases. **Acta Urológica Portuguesa**, v. 18, n. 2, p. 17-21, 2001.
- LAFOREST, M. F. et al. Fundamental significance of specific phosphodiesterases in the control of spontaneous meiotic resumption in porcine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 70, n. 3, p. 361-372, 2005.

LI, R.; ALBERTINI, D. F. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. **Nature**, v. 14, p. 141-152, 2013.

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. State-of-the-art embryo technologies in cattle. **Soc Reprod Fertil Suppl**, v. 64, p. 315-325, 2007.

LUCIANO, A. M. et al. Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism(s). **Biology of reproduction**, v. 85, n. 6, p. 1252-9, 2011.

MADISON, V.; AVERY, B.; GREVE, T. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 27, p.1-11, 1992.

MASCIARELLI, S. et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, p. 196-205, 2004.

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

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

MEIRELLES, F.V. et al. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 13-20, 2004.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction Development**, v. 55, n. 1, p. 89-95, 2000.

MOCHLY-ROSEN, D. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. **Science**, v. 268, p. 247-251, 1995.

MOTLIK J. et al. Interplay between cdc2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. **Theriogenology**, v.49, p.461, 1998.

NINO-SOTO, M.I.; BASRUR, P.K.; KING, W.A. Impact of *In vitro* Production Techniques on the Expression of X-linked Genes in Bovine (*Bos taurus*) Oocytes and Pre-Attachment Embryos. **Molecular reproduction and development**, New York, v.74, p.144-153, 2007.

- NOGUEIRA, D. et al. Effect of phosphodiesterase type 3 inhibitor on developmental competence of immature mouse oocytes in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 6, p. 2045–2052, 2003.
- OH, B. et al. A substrate in the MAP kinase pathway in mouse oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 50, p. 240-240, 1998.
- PAN, H.; O'BRIEN, M. J.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J. J.; SCHULTZ, R. M. Transcript profiling during mouse oocyte development and the effect of gonadotropin priming and development in vitro. **Developmental Biology**, v. 286, n. 2, p. 493-506, 2005.
- PINCUS, G.; ENZMANN, E. V. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. The activation of ovarian eggs. **Journal of Experimental Medicine**, v. 62, n. 5, p. 665-675, 1935.
- RATNER, A. effects of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone upon cyclic AMP and cyclic GMP levels in rat ovaries *in vitro*. **Endocrinology**, v. 99, n. 6, p. 1496-1500, 1976.
- RICHARD, F. J.; TSAFRIRI, A.; CONTI, M. Role os phosphodiesterases type 3A in rat oocyte maturation. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1444-1451, 2001.
- RICHARD, F. J. Regulation of meiotic maturation. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 4-6, 2007.
- RICHARDS, J.S. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiology Reviews**, v. 60, p. 51-89, 1980.
- RODRIGUEZ, K. F.; FARIN, C. E. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 16, p.55–67, 2004.
- RUDERMAN, J. V. MAP kinase and the activation of quiescent cells. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 5, n. 2, p. 207-213, 1993.
- SANDRI, L. R. **Efeito de bloqueadores meióticos na maturação e ultra-estrutura de oócitos e sua consequência na produção de embriões in vitro**. 2007. Dissertação- Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007.
- SASSEVILLE, M.; COTE, N.; GAGNON, M. C.; RICHARD, J. P. 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. 5568–5576, 2008.
- SASSEVILLE, M. et al. Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 415-425, 2009.

SCHWARZ, K. R. L. et al. Fetal calf serum influences cyclic GMP pathway, which in turn affects the lipid content in in-vitro matured bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 1, p. 196–196, 2013.

SCHWARZ, K. R. L. et al. Effect of nitric oxide on the cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway during meiosis resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 81, n. 4, p. 556–564, 2014.

SEGER, R.; KREBS, E. The MAPK signaling cascade. **FASEB Journal**, v. 9, n. 9, p. 726-735, 1995.

SHIMADA, M.; TERADA, T. FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. **Molecular Human reproduction**, v. 8, n. 7, p. 612-618, 2002.

SHU, Y. et al. Effects of cilostamide and forskolin on the meiotic resumption and embryonic development of immature human oocytes. **Human reproduction**, v. 23, n. 3, p. 504–13, 2008.

SILVA, I. O. **Inibição e reversão da maturação nuclear, avaliação da maturação citoplasmática e produção de esteróides em complexos cumulus oophorus bovinos cocultivados com hemiseções foliculares em meio de cultura definido**. 2008. Dissertação - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília; Brasília, 2008.

SIMPLÍCIO, A. A., FREITAS, V. J. F., FONSECA, J. F. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. v. 31, p. 234-246, 2007.

SINGH, B.; BARBE, G. J.; ARMSTRONG, D. T. Factors influencing resumption of meiotic maturation and cumulus expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes in vitro. **Molecular reproduction and Development**, v. 36, n. 1, p. 113-119, 1993.

SIRARD, M. A.; FIRST, N. L. In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 229-234, 1998.

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

SU, Y. Q., RUBINSTEIN, S.; LURIA, A.; LAX Y.; BREITBART, H. Involvement of MEK-mitogen-activated protein kinase pathway in follicle-stimulating hormone-induced but not spontaneous meiotic resumption of mouse oocytes. **Biology of Reproduction**, v.56, p.358-365, 2001.

SU, Y. Q. et al. Mitogen-activated protein kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin – induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. **Endocrinology**, v. 143, n. 6, p. 2221-2232, 2002.

SUN, Q. Y. et al. Regulation of mitogenactivated protein kinase phosphorylation, microtubule organization, chromatin behavior, and cell cycle progression by protein phosphatases during pig oocyte maturation and fertilization in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 580-588, 2002.

TAN, J. H. et al. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, p. 1-9, 2009.

THOMAS, R. E.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. **Dev Biol**, v. 244, p. 215-225, 2002.

THOMAS, R. E.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctions 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.; BRÄNNSTRÖM, M.; HILLENSJÖ, T. Different effects of cyclic nucleotide derivatives upon the rat oocyte-cumulus complex in vitro. **Acta Physiologica**, v. 122, n. 4, p. 507-513, 1984.

TÖRNELL, J.; BILLIG, H.; HILLENSJO, 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.

TRALDI, A. S. Biotécnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes. In: CONGRESSO INTERNACIONAL FEINCO, 3, 2008, São Paulo. **Anais...** São Paulo: 2008. p.1-11.

TSAFRIRI, A. et al. 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.

VACCARI, S.; et al. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 595-604, 2009.

VANHOUTTE, L. et al. Nuclear and cytoplasmic maturation of in vitro matured human oocytes after temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor. **Human reproduction**, v. 22, p. 1239-1246, 2007.

VERLHAC, M. H. et al. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. **Development**, v. 120, p. 1017-1025, 1994.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. In: ENCONTRO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 21, 2007, Salvador. **Anais...** Salvador: 2007, p. 915-919.

YAMADA, M.; ISAJI, Y. Structural and functional changes linked to, and factors promoting, cytoplasmic maturation in mammalian oocytes. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 10, p. 69-79, 2011.

WANG, Q; SUN, Q. Y. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. **Reproduction, Fertility and Development** , v. 19, p. 1-12, 2007.

WANG, S .et al. PDE5 modulates oocyte spontaneous maturation via cGMP-cAMP but not cGMP-PKG signaling. **Frontiers in Bioscience**, v.13, p.7087-7095, 2008.

WEHREND, A.; MEINECKE, B. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. **Animal Reproduction Science**, v. 66, n. 3-4, p. 175-184, 2001.

ZAFFALON, F.G. et al. cGMP inhibits PDE3 activity in porcine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, p.282, 2013.

ZHANG, M.; XIA, G.; ZHOU, B.; WANG, C. Gonadotropin-controlled mammal oocyte meiotic resumption. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p.282-296, 2007.

ANEXO

ANEXO A - PREPARAÇÃO DOS INIBIDORES

- Inibidor da PDE3: cilostamida (BML-PD125-0025, Enzo Life Sciences, Inc. Farmingdale, NY, EUA)

Foi preparado em solução estoque de 100mM em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma D2650) e armazenado em freezer -20°C.

- Inibidor da PDE8: dipiridamole (P 5840AK Enzo Life Sciences, Inc. Farmingdale, NY, EUA)

Foi preparado em solução estoque de 100 mM em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma D2650) e armazenado em freezer -20°C.

- Inibidor da PDE5: sildenafil (338584, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Califórnia, EUA)

Foi preparado em solução estoque de 100mM em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma D2650) e armazenado em freezer -20°C.

- Inibidor das PDEs 1, 2, 3, 4, 7, 10 e 11: IBMX (H 3248b Enzo Life Sciences, Inc. Farmingdale, NY, EUA)

Foi preparado em solução estoque de 100mM em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma D2650) e armazenado em freezer -20°C.

- Ativador de adenilato ciclase: forskolin (H1105b, Enzo Life Sciences, Inc. Farmingdale, NY, EUA)

Foi preparado em solução estoque de 6mM em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma D2650) e armazenado em freezer -20°C.