UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

RAMON CESAR BOTIGELLI

**“O ÓXIDO NÍTRICO E AS FOSFODIESTERASES
NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS”**

Pirassununga

2014

RAMON CESAR BOTIGELLI

**“O ÓXIDO NÍTRICO E AS FOSFODIESTERASES
NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia,
Área de concentração Qualidade e Produtividade Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia 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

B749o Botigelli, Ramon Cesar
O óxido nítrico e as fosfodiesterases na maturação de
oócitos bovinos / Ramon Cesar Botigelli. --
Pirassununga, 2014.
63 f.
Dissertação (Mestrado) -- 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. Cláudia Lima Verde Leal.

1. Oócitos bovinos 2. Maturação in vitro 3. Óxido
nítrico 4. Fosfodiesterases. I. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, Sidnei e Silmara, minha irmã Gabriella, pelo apoio incondicional e suporte oferecido em todos os momentos.

Agradecimentos

Agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Claudia Lima Verde Leal pela oportunidade cedida para a realização deste trabalho, orientação e reflexões nos momentos de dificuldade e pela confiança em mim depositada.

Aos integrantes do laboratório de citologia: Kátia, Fabi, Fernanda, M. Carol, Hugo, Ligia e M. Helena pelos conselhos e ensinamentos transmitidos durante todos os dias e principalmente pela amizade construída.

À todos amigos e agregados do Laboratório de Histologia Animal e Morfo-fisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD).

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

RESUMO

BOTIGELLI, R. C. **O ÓXIDO NÍTRICO E AS FOSFODIESTERASES NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS**, 2014. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

O óxido nítrico (NO) é um mensageiro químico encontrado em diversos tipos celulares como células endoteliais, neurônios e macrófagos. A síntese do NO é realizada pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Um dos mecanismos de ação do NO é dado pela ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), resultando na produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), um mensageiro secundário nessa via de sinalização celular. O GMPc por sua vez é capaz de modular a atividade de algumas fosfodiesterases (PDEs), enzimas responsáveis pela degradação do GMPc e de outro nucleotídeo cíclico, o monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da elevação dos níveis de NO por meio do doador de óxido nítrico (SNAP) e o uso de inibidores de diferentes isoformas de fosfodiesterases no meio de cultivo durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos sobre a retomada da meiose, concentração de NO e níveis de GMPc e AMPc. Deste modo, os complexos cumulus-oócito (CCOs) bovinos foram cultivados por até 9 horas com o doador de NO (SNAP – 10^{-7} M) associado ou não ao inibidor de GCs (ODQ – 10^{-5} M) e associado ou não aos inibidores das fosfodiesterases, PDE5 (Sildenafil - 10 μ M), PDE3 (Cilostamide - 20 μ M) e PDE8 (Dipiridamole - 50 μ M). As amostras foram avaliadas quanto a taxa de retomada da meiose, níveis de NO (9h de MIV) e níveis dos nucleotídeos cíclicos GMPc e AMPc (0, 1, 2 e 3h de MIV). O SNAP retardou o rompimento da vesícula germinativa com 9 horas de cultivo ($P<0,05$) e quando o SNAP foi associado ao ODQ o efeito foi revertido ($P>0,05$). A inclusão de SNAP no cultivo, os níveis de NO foram elevados ($P<0,05$). Os níveis de GMPc só foram influenciados positivamente pelo SNAP com 1 hora de cultivo

($P < 0,05$) e após 2 e 3 horas, esta influência não persistiu ($P > 0,05$), visto que o ODQ aboliu o efeito. A influência do SNAP foi devido ao estímulo da GCs. Para os níveis de AMPc, o doador de NO não foi capaz de influenciar suas concentrações durante as 3 horas de cultivo ($P > 0,05$). Quando o SNAP foi associado ao Sildenafil (SNAP+SIL) não houve diferença em relação ao grupo imaturo ($P > 0,05$), porém, também não se diferiu do tratamento SNAP e controle ($P > 0,05$). Para as taxas de retomada de meiose todos os tratamentos foram eficientes e conseguiram retardar a quebra da vesícula germinativa diante do grupo controle ($P < 0,05$), sendo o grupo SNAP+CIL mais eficiente. Para os níveis de AMPc, nem mesmo com a utilização de inibidores das PDE3 e PDE8 foi possível atenuar a queda do nucleotídeo. Em conclusão, o SNAP exerceu influência na retomada da meiose, na concentração de NO e nos níveis de GMPc sendo que sua ação se deve à atividade da GCs. Não houve influência sobre os níveis de AMPc, quando o SNAP foi associado a inibidores específicos de fosfodiesterases, mesmo quando apresentaram efeito sobre a retomada da meiose. A via NO/GCs/GMPc não parecer atuar sobre a via PDE3/AMPc, sugerindo a ação de outras vias no controle da meiose.

Palavras-chaves: oócitos bovinos, maturação *in vitro*, óxido nítrico, fosfodiesterases.

ABSTRACT

BOTIGELLI, R. C. THE NITRIC OXIDE AND PHOPHODIESTERASES IN BOVINE OOCYTES MATURATION, 2014. 63 p. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

Nitric oxide (NO) is a chemical messenger found in many cell types such as endothelial cells, neurons and macrophages. The synthesis of NO is made by the action of nitric oxide synthase (NOS). One of the mechanisms of action of NO is given by the activation of the enzyme soluble guanylate cyclase (sGC), resulting in the production of cyclic guanosine monophosphate (cGMP), a secondary messenger in this pathway of cell signaling. The cGMP in turn is capable of modulating the activity of some phosphodiesterases (PDEs), enzymes responsible for degradation of cGMP and other cyclic nucleotide, cyclic adenosine monophosphate (cAMP). The objective of this study was to investigate the effects of elevated levels of NO via nitric oxide donor (SNAP) and the use of inhibitors of phosphodiesterase isoforms in the culture medium during in vitro maturation (IVM) of bovine oocytes on resumption of meiosis, the concentration of NO and cGMP and cAMP levels. Thus, the complexes cumulus-oocyte (COCs) were cultured for cattle up to 9 hours with the NO donor (SNAP – 10^{-7} M) with or without the inhibitor of sGC (ODQ - 10^{-5} M) and with or without to inhibitors of phosphodiesterase PDE5 (Sildenafil - 10 μ M), PDE3 (Cilostamide - 20 μ M) and PDE8 (Dipyridamole - 50 μ M). The samples were evaluated for the rate of resumption of meiosis, levels of NO (9h - IVM) and levels of cyclic nucleotides cGMP and cAMP (0, 1, 2 and 3h - IVM). The SNAP delayed with germinal vesicle breakdown of 9hours cultivation ($P < 0.05$) when SNAP was associated with ODQ was reversed the effect ($P > 0.05$). The inclusion of SNAP cultivation, NO levels were increased ($P < 0.05$). cGMP levels were positively influenced only by the snap 1 hour in culture ($P < 0.05$) and after 2 and 3 hours, this effect was not maintained ($P < 0.05$), whereas ODQ

abolished the effect. The influence of SNAP was due to stimulation of GCs. For cAMP levels, the NO donor was not able to influence their concentrations during the 3 h incubation ($P>0.05$). When SNAP was associated with Sildenafil (SIL+SNAP) there was no difference compared to the immature group ($P>0.05$), however, also did not differ from SNAP treatment and control ($P>0.05$). Rates for resumption of meiosis all treatments were efficient and able delay before germinal vesicle breakdown in the control group ($P<0.05$), with SNAP+CIL group more efficient. For cAMP levels, even with the use of inhibitors of PDE3 and PDE8 was possible to alleviate the decrease of the nucleotide. In conclusion, SNAP exerted influence on the resumption of meiosis, the concentration of NO and cGMP levels and that its action is due to a GCs activity. There was no effect on cAMP levels, when SNAP was associated with specific phosphodiesterase inhibitors, even when presented effect on the resumption of meiosis. The pathway NO/sGC/cGMP seem not act on the pathway PDE3/AMPC, suggesting the action of other pathways in the control of meiosis.

Keywords: bovine oocytes, *in vitro* maturation, nitric oxide, phosphodiesterases.

Lista de figuras

Figura 1. Representação simplificada da foliculogênese e do crescimento e maturação do oócito em mamíferos (COLLADO-FERNANDEZ; PICTON; DUMOLLARD, 2012).

Figura 2. Resumo do desenvolvimento folicular e oogênese em bovinos (RODRIGUEZ; FARIN, 2004).

Figura 3. Representação das 11 famílias de fosfodiesterases classificadas pela sua especificidade entre os nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc.

Figura 4. Modelo hipotético gráfico do cross-talk entre o GMPc sintetizado nas células da granulosa que migram através das gap junctions para o oócito, interferindo na atividade da PDE3A.

Figura 5. Concentrações de nitrato produzidos por CCOs bovinos maturados in vitro durante 9 horas sem (controle) ou com o doador de óxido nítrico SNAP. Resultados de 5 repetições.

Figura 6. Variação temporal dos níveis de GMPc durante 0, 1, 2 e 3 horas de maturação in vitro em cada tratamento avaliado. a-d Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os tempos de cultivo ($P < 0,05$). Resultados de 4 repetições.

Figura 7. Representação gráfica dos níveis de GMPc durante 0, 1, 2 e 3 horas de maturação in vitro (a-f letras maiúsculas representam a diferenças entre os tratamentos $P < 0,05$). Resultados de 4 repetições.

Figura 8. Variação temporal dos níveis de AMPc durante 0, 1, 2 e 3 horas de maturação in vitro em cada tratamento avaliado. a-c Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os tempos de cultivo ($P < 0,05$). Resultados de 4 repetições.

Figura 9. Representação gráfica dos níveis de AMPc durante 0, 1, 2 e 3 horas de maturação in vitro (* Indica diferença diante a todos os tratamentos, a-c letras minúsculas representam as diferenças entre os tratamentos em cada intervalo de tempo $P < 0,05$). Resultados 4 repetições.

Figura 10. Representação gráfica dos níveis de GMPc durante 0 e 1 horas de maturação in vitro (a-b letras maiúsculas representam as diferenças entre os tratamentos em cada intervalo de tempo $P < 0,05$). Resultados de 5 repetições.

Figura 11. Representação gráfica da queda dos níveis de GMPc durante 0 e 1 horas de cultivo in vitro (a-b letras maiúsculas representam as diferenças entre os tratamentos em cada intervalo de tempo $P < 0,05$). Resultados de 5 repetições.

Figura 12. Imagens representativas de oócitos que foram cultivados durante 9 horas e que se mantiveram em estadio de vesícula germinativa. Grupo controle (A); Grupo SNAP+CIL (B).

Figura 13. Imagens representativas de oócitos que foram cultivados durante 9 horas que romperam a vesícula germinativa e estão em progressão ao estágio de metáfase I. Grupo controle (A); Grupo SNAP+CIL (B).

Figura 14. Níveis de AMPc de oócitos bovinos maturados in vitro com um doador de óxido nítrico associado a diferentes inibidores de fosfodiesterases, durante 0 e 1h de maturação (letras minúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos $P < 0,05$). Resultados 6 repetições.

Lista de tabelas

Tabela 1. Proporção de oócitos bovinos maturados in vitro que permaneceram imaturos (VG) e que apresentaram a retomada da meiose identificada pelo rompimento da vesícula germinativa (RVG) após 9 h de cultivo.

Tabela 2. Proporção de oócitos bovinos maturados in vitro em estágio de vesícula germinativa (VG) e que passaram pelo rompimento de vesícula germinativa (RVG) que foram cultivados com o doador de óxido nítrico associado a diferentes inibidores de fosfodiesterases.

Sumário

1.	Introdução.....	1
2.	Objetivo.....	2
2.1.	Objetivos específicos	3
3.	Revisão bibliográfica.....	3
3.1.	Oogênese e foliculogênese	3
3.2.	Maturação oocitária	6
3.2.1.	Maturação nuclear	7
3.2.2.	Maturação citoplasmática	7
3.2.3.	Maturação molecular	9
3.2.4.	Controle da Maturação oocitária	10
3.3.	O óxido nítrico.....	11
3.3.1.	O óxido nítrico na maturação	12
3.4.	Os nucleotídeos cíclicos	13
3.4.1.	GMPc e AMPc na maturação.....	14
3.5.	As fosfodiesterases e a maturação.....	15
4.	Material e métodos	17
4.1.	Local de execução do projeto	17
4.2.	Reagentes e meios de cultivo	18
4.3.	Obtenção de complexos cumulus-oócitos (CCOs)	18
4.4.	Maturação <i>in vitro</i>	18
4.4.1.	Meios de maturação	19
4.5.	Determinação do estágio da meiose.....	19
4.5.1.	Imunofluorescência (anti-lamina A/C)	19
4.5.2.	Coloração com orceína	20
4.6.	Mensuração dos níveis de óxido nítrico (Método de Griess)	21
4.7.	Mensuração dos níveis dos nucleotídeos AMPc e GMPc.....	21
4.8.	Análise estatística	22
4.9.	Delineamento experimental	22

4.9.1.	Experimento 1: O efeito do SNAP no cultivo de oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i> nas taxas de retomada da meiose e níveis de NO.	22
4.9.2.	Experimento 2: O efeito do SNAP no cultivo de oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i> para os níveis de GMPc e AMPc.	23
4.9.3.	Experimento 3: O efeito do SNAP associado a inibidor da PDE5 na maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos para os níveis de GMPc.	23
4.9.4.	Experimento 4: O efeito do SNAP associado a diferentes inibidores de PDEs na maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos para a retomada da meiose e níveis de AMPc.	23
5.	Resultados.....	24
5.1.	Experimento 1 - O efeito do SNAP no meio de cultivo de oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i> para as taxas de retomada da meiose e níveis de NO.....	24
5.1.1.	Retomada da meiose.....	24
5.1.2.	Níveis de óxido nítrico.....	25
5.2.	Experimento 2: O efeito do SNAP no cultivo de oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i> para os níveis de GMPc e AMPc.	26
5.3.	Experimento 3: O efeito do SNAP associado a inibidor da PDE5 na maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos para os níveis de GMPc.	32
5.4.	Experimento 4: O efeito do SNAP associado a diferentes inibidores de PDEs na maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos para a retomada da meiose e níveis de AMPc.	33
5.4.1.	Retomada da meiose.....	33
5.4.2.	Níveis de AMPc.	36
6.	Discussão	37
7.	Conclusões	48
8.	Referências bibliográficas.....	49

1. Introdução

Avanços nas áreas de biotecnologia da reprodução vem trazendo grandes benefícios na produção de embriões *in vitro* utilizados para pesquisas científicas e para a produção comercial. No entanto, mesmo com todos os avanços nos processos de maturação, fertilização e cultivo embrionário, apenas 30-40% dos oócitos maturados e fertilizados *in vitro* se desenvolvem até blastocisto (SIRARD et al., 2006; WARD et al., 2002; WIEMER et al., 1991), em oócitos maturados e fertilizados *in vivo* estas taxas se aproximam de 80% para o desenvolvimento até blastocisto (RIZOS et al., 2002). Estes dados indicam que ainda há muito para se pesquisar, até as taxas da produção *in vitro* (PIV) se aproximar das taxas de embriões *in vivo*.

O óxido nítrico (NO) é um mensageiro químico, encontrado em diversos tipos celulares, como células endoteliais, neurônios e macrófagos. A síntese do NO é realizada pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a partir de um aminoácido (L-arginina). A NOS pode ser encontrada em três isoformas funcionais, a NOS neural (NOS1 ou nNOS), a NOS induzível (NOS2 ou iNOS) e a NOS endotelial (NOS3 ou eNOS) (SESSA et al., 1994). A NOS já foi identificada em diversos órgãos envolvidos no processo de reprodução, como: ovários, tuba, útero, oócitos e embriões (CHATTERJEE et al., 1996).

Em bovinos, com a inibição da síntese de NO em oócitos durante a maturação *in vitro*, ocorre a diminuição na produção de blastocistos (MATTA et al., 2009). Em altas concentrações, no entanto, a progressão meiótica para meiose II e o desenvolvimento embrionário é comprometido (SCHWARZ et al., 2010). Bilodeau-Goeseels (2007), descreve que baixas concentrações de NO podem estimular a maturação de oócitos bovinos, porém, em altas concentrações, o NO pode comprometer o progresso da meiose. Portanto, os efeitos do NO podem ser benéficos ou não dependendo de sua concentração.

Um dos mecanismos do NO é dado pela ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), resultando na produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), um mensageiro secundário nessa via de sinalização

celular. O GMPc por sua vez é capaz de modelar a atividade de uma série de fosfodiesterases (PDEs), enzimas responsáveis pela degradação do GMPc e de outro nucleotídeo cíclico, o monofosfato cíclico de adenosina (AMPc).

Este nucleotídeo que é sintetizado pela enzima adenilato ciclase (AC), é um dos principais responsáveis pelo controle da maturação meiótica de oócitos, sendo um segundo mensageiro da via de sinalização das gonadotrofinas sobre o tecido ovariano. Os níveis de AMPc são balanceados pela sua síntese feita pela AC e sua degradação causada pelas PDEs (LAFOREST et al., 2005).

O controle da maturação realizado por este nucleotídeo, se deve a queda de sua concentração, causando a diminuição da fosforilação de certas proteínas pela ação da proteína cinase dependente de AMPc (PKA), que é necessária para a maturação do oócito. A inativação da PKA em oócitos permite a ativação da subunidade catalítica do fator promotor da maturação (MPF), induzindo a retomada da meiose (HAN; CONTI, 2006).

Sabe-se que a via NO/GMPc atua nos níveis de AMPc, onde o GMPc é capaz de inibir a PDE3, responsável pela degradação do AMPc, que leva à retomada da meiose. Esse mecanismo foi relatado no envolvimento da retomada da meiose em roedores (WANG et al., 2008)

Levando em consideração que o NO pode influenciar a maturação de oócitos bovinos e que uma de suas principais vias de sinalização envolve o GMPc, a hipótese deste trabalho foi investigar se níveis elevados de NO conseguem manter os níveis de GMPc elevados durante a maturação e assim também afetar os níveis de AMPc mantendo o bloqueio meióticos dos oócitos.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da elevação dos níveis de NO por meio do doador de óxido nítrico (SNAP) e o uso de inibidores de diferentes isoformas de fosfodiesterases no meio de cultivo durante a

maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre a retomada da meiose, níveis de GMPc e AMPc.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar se a elevação da disponibilidade de NO durante a MIV exerce uma influência a retomada de meiose;
- Avaliar se o óxido nítrico atua sobre a enzima GCs, e consequentemente, atua sobre os níveis de GMPc;
- Avaliar se elevação da disponibilidade de NO durante a MIV atua sobre os níveis de AMPc;
- Avaliar se a elevação da disponibilidade de NO associada a inibição da PDE5 causa uma influência sobre os níveis de GMPc;
- Avaliar se a elevação da disponibilidade de NO associada ou não a inibição da PDE3, PDE5 e PDE8 exerce uma influência a retomada de meiose e nos níveis de AMPc;

3. Revisão bibliográfica

3.1. Oogênese e foliculogênese

A formação dos oócitos em mamíferos têm seu início durante a fase embrionária, onde todo o aparato celular é desenvolvido a partir das células germinativas primordiais (PGCs), que se desenvolvem e se diferenciam até a formação de um oócito maduro, pronto para a fecundação. Estas diversas etapas envolvidas no processo de formação do oócito são denominadas como oogênese.

Estes eventos para a formação do oócito podem ser divididos em etapas como sugerido por van den Hurk e Zhao (2005): (1) formação das células germinativas primordiais; (2) migração das PGCs para as futuras gônadas; (3) colonização das gônadas por PGCs; (4) diferenciação de PGCs

em oogônias; (5) proliferação das oogônias; (6) início da meiose e (7) bloqueio em fase de diplóteno da prófase I da meiose.

A migração, proliferação e colonização das PGCs para as gônadas em desenvolvimento são controlados por diversos fatores e também dependentes da interação entre as PGCs e as células somáticas circundantes.

Algumas proteínas da família da TGF β como a BMP4 e BMP8b são sintetizadas pelas células estabelecidas na ectoderme e a BMP2 pelas células da endoderme, estas proteínas são fatores específicos necessários para a formação e regulação da expressão genica das PGCs. Outras proteínas também já tiveram sua função caracterizada na oogênese, como BLIMP1 e PRDM14, que são fundamentais para a proliferação e migração respectivamente (JAGARLAMUDI; RAJKOVIC, 2011), assim como OCT4, NANOG e FIG α que são fundamentais para a manutenção das PGCs (JAGARLAMUDI; RAJKOVIC, 2011; YAMAGUCHI et al., 2009) e as proteínas NANOS3 e DND1 que são proteínas de ligação de RNA que protegem PGCs de apoptose (JULATON; PERA, 2011; SOYAL; AMLEH; DEAN, 2000).

Próximo ao nascimento do feto, todas as células germinativas femininas estão em prófase da primeira divisão meiótica, mas, ao invés de prosseguirem à metáfase, estas ficam bloqueadas no diplóteno, chamado de estágio de vesícula germinativa (GV) (AUSTIN; SHORT, 1982).

Após a vida natal os oócitos sofrem processos para seu crescimento e maturação, como: estocagem de mRNAs, proteínas, substratos metabólicos e organelas. Os oócitos primários que se mantem no estado de diplóteno da primeira divisão começam a ser envolvidos por uma camada de células achatadas pre-granulosas e uma membrana basal para se tornar um folículo primordial (figura 1).

Figura 1. Representação simplificada da foliculogênese e do crescimento e maturação do oócito em mamíferos (COLLADO-FERNANDEZ; PICTON; DUMOLLARD, 2012).

Seguido da ativação do crescimento, o folículo primordial é envolto por uma camada completa de células cuboides da granulosa tornando-o um folículo primário (PICTON, 2001). Com o decorrer do crescimento folicular, as células da granulosa continuam se proliferando e a camada da teca se desenvolve, que fornece um suplemento de sangue independente ao folículo (YOUNG; MCNEILLY, 2010).

Além disso, com a formação do antro, ocorre a diferenciação das células da granulosa em duas populações espacialmente e funcionalmente distintas: as células da granulosa murais, que se alinham a membrana basal e tem sua função endócrina, e as células do cumulus, que estão intimamente associadas ao oócito e contribuem para o metabolismo e maturação deste. Ambos os tipos de células formam o complexo cumulus-oócito (COC) (figura 1).

A foliculogênese ovariana é um processo biológico complexo, difícil de analisar devido à sua natureza e sua dinâmica, com o envolvimento de diferentes tipos de células e suas interações. O crescimento e o desenvolvimento dos folículos ovarianos requerem uma série de acontecimentos coordenados, que induzem as alterações morfológicas e funcionais do folículo, levando à diferenciação celular e desenvolvimento de oócitos (figura 2).

Figura 2. Resumo do desenvolvimento folicular e oogenese em bovinos (RODRIGUEZ; FARIN, 2004).

3.2. Maturação oocitária

A retomada da meiose do oócito tem início logo após a onda ovulatória da gonadotrofina (LH) *in vivo*, para a maturação *in vitro*, a retomada da meiose ocorre logo após a retirada do oócito do ambiente folicular (HAUGHIAN et al., 2004), quando este passa por diversos processos para sua capacitação, tornando possível a sua fertilização.

Estes processos de alterações moleculares, estruturais e bioquímicas ocorrem tanto no núcleo e citoplasma do oócito quanto nas células do cumulus (GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004).

Dentre todas as alterações e processos de capacitação para a fecundação do oócito, ressalta-se a redistribuição das organelas citoplasmáticas, acúmulo de RNAm, acúmulo de proteínas e fatores de transcrição na maturação citoplasmática e a dinâmica de separação dos cromossomos na maturação nuclear.

Segundo o modelo proposto por Sirard (2001), podemos classificar estes eventos em:

- Maturação nuclear: na qual se refere a alteração do estadio da cromatina vesícula germinativa (GV) para a fase de Metáfase II (MII).
- Maturação citoplasmática: onde engloba todas as mudanças na distribuição e organização das organelas individuais na GV até o estágio de Metáfase II.

- Maturação molecular: onde traz toda a herança de instruções acumuladas durante o fase GV e que controla a maturação nuclear e a progressão citoplasmática.

3.2.1. Maturação nuclear

A maturação nuclear do oócito refere-se aos processos do primeiro bloqueio meiótico em estágio de vesícula germinativa ao segundo bloqueio meiótico em metáfase II, com a quebra da vesícula germinativa e a condensação dos cromossomos como pontos principais destas alterações (JONES, 2004).

A maturação nuclear do oócito é ativada automaticamente após a remoção do oócito de seu folículo. Onde a retomada da meiose induz a uma parada de transcrição e imediatamente limita a programação molecular do oócito. Portanto, as ações tomadas para modificar a programação molecular do oócito deve ocorrer antes rompimento da vesícula germinativa (SIRARD, 2001).

Gandolfi e Gandolfi (2001) descrevem que mesmo sendo processos distintos, a maturação nuclear e a maturação citoplasmática são eventos interligados que ocorrem simultaneamente em determinados momentos.

3.2.2. Maturação citoplasmática

A reorganização das organelas no citoplasma só é possível graças a dinâmica das proteínas do citoesqueleto durante a maturação, sendo divididas em três grupos: microtúbulos, filamentos de actina (microfilamentos) e filamentos intermediários (FERREIRA et al., 2009).

As mitocôndrias situadas na periferia do citoplasma quando o oócito está imaturo em estágio de vesícula germinativa, migram para o centro do citoplasma, onde é necessário uma maior produção de ATP para a síntese de proteínas que darão suporte à conclusão da maturação e do desenvolvimento

embrionário (FAIR et al., 1997; KRISHER; BAVISTER, 1998; STOJKOVIC et al., 2001).

Os grânulos corticais que estão distribuídos por todo o citoplasma do oócito com o decorrer da maturação, começam a ocupar todo o córtex logo abaixo da membrana plasmática. Este espaço é ocupado estrategicamente para que logo após a entrada de um espermatozoide pela membrana, o conteúdo dos grânulos corticais seja expulso para a superfície da célula e provoque uma alteração estrutural na zona pelúcida, impossibilitando a poliespermia (WESSEL; CONNER; BERG, 2002; WESSEL et al., 2001).

A síntese proteica não só é indispensável somente durante a progressão da maturação no oócito, mas também durante a formação do zigoto e da embriogênese inicial. Onde é necessária uma quantidade apropriada de ribossomos no gameta.

Quando o oócito ainda está em um folículo primordial, seu nucléolo onde os ribossomos são sintetizados é composto exclusivamente pela forma granular, sinalizando a ausência de atividade da síntese de ribossomos (FAIR et al., 2001; HYTTEL et al., 2001). Durante a fase de crescimento do oócito e ativação do genoma embrionário o nucléolo apresenta a subunidade fibrilo-granular, onde se reflete, em uma alta atividade de síntese de ribossomos, consequentemente, a síntese proteica.

Durante a meiose, no estágio de metáfase I Ferreira et. al., (2009) relatam que há aproximadamente três vezes mais síntese de proteínas no oócito do que no estágio de quebra de vesícula germinativa. Com avançar da maturação, em estágio de metáfase II, o oócito exhibe níveis basais de tradução de proteínas. Esta alteração na atividade da síntese proteica é causada pela ausência de um nucléolo funcional, onde a cromatina está condensada em forma de cromossomos (TOMEK; TORNER; KANITZ, 2002).

Durante a maturação e fertilização de oócitos mamíferos a dinâmica de membranas do complexo de Golgi ainda necessitam de mais informações para suas funções e seu papel serem compreendidos (PAYNE; SCHATTEN, 2003).

Em oócitos bovinos, sabe-se que no estágio de vesícula germinativa são encontrados fragmentos de Golgi que modificam-se em vesículas durante a quebra da vesícula germinativa (HYTTEL et al., 1986; MORENO; SCHATTEN; RAMALHO-SANTOS, 2002; PAYNE; SCHATTEN, 2003). Apesar dos relatos até o momento, os dados da literatura com relação ao papel exercido pelo complexo de Golgi na maturação e eventos subsequentes permanecem conflitantes.

As diversas funções do retículo endoplasmático, são realizadas através de suas membranas que são fisiologicamente ativas, onde o citoesqueleto interage com diferentes sítios específicos para funções distintas. Dentre as funções, pode-se destacar o enovelamento de proteínas e sua degradação, o metabolismo de lipídeos, a compartimentalização do núcleo, a regulação do gradiente de íons Ca^{2+} e a síntese de membranas (LIPPINCOTT-SCHWARTZ; RBERTS; HIRSCHBERG, 2000).

Este sistema de regulação tem papel importante durante a maturação e desenvolvimento embrionário inicial. Em oócitos de camundongos, Kline (2000) descreve que em estágio de VG o retículos endoplasmático se distribuem uniformemente pelo ooplasma, com o decorrer do desenvolvimento até o estágio de metáfase II, a distribuição é alterada, onde os retículos endoplasmáticos migram para as regiões corticais.

Com o decorrer da maturação a sensibilidade do sistema de liberação de cálcio aumenta, com a entrada do espermatozóide no oócito ocorre uma elevada liberação de cálcio dos retículos, que acarreta na ativação para o início do desenvolvimento (KLINE, 2000).

3.2.3. Maturação molecular

A maturação molecular corresponde a transcrição, estocagem e processamento de RNAm expressos pelos genes que serão traduzidos em proteínas pelos ribossomos (FERREIRA et al., 2009). O desenvolvimento embrionário inicial é dependente do acúmulo de transcritos em forma estável

no citoplasma do oócito durante a gametogênese, este armazenamento é fundamental pois o genoma embrionário em bovinos só é ativado no estágio de 8-células, quando este então passa a processar seus novos transcritos (WHITWORTH et al., 2004).

3.2.4. Controle da Maturação oocitária

Algumas proteínas estão envolvidas nos mecanismos de maturação, dentre estas as proteínas do complexo MPF (*maturation promoting fator*) e as proteínas da família MAPK (*mitogen activated protein kinase*) (SIRARD; RICHARD; MAYES, 1998). O complexo proteico MPF é responsável por diversas alterações morfológicas durante a maturação e está envolvido na regulação da condensação dos cromossomos, no rompimento do envelope nuclear (KIM et al., 2000), formação do fuso meiótico e extrusão do 1º corpúsculo polar.

A atividade do MPF se altera durante o decorrer da maturação, quando é baixa no início, mas se eleva e atinge a sua máxima atividade em metáfase I (MI), após a retomada da meiose sua atividade decai novamente e voltando a se elevar na metáfase II (MOTLIK et al., 1998). A sua inativação em oócitos no estágio de MII é causada pela fecundação ou ativação partenogenética que é necessária para a conclusão da meiose, para assim ocorrer o início do desenvolvimento embrionário (TAIEB; THIBIER; JESSUS, 1997).

A ativação do MPF caracteriza bioquimicamente a retomada da meiose, provocada pela redução da concentração de AMPc, reduzindo a atividade da PKA, que assim resulta na ativação da atividade do MPF (GOREN; DEKEL, 1994).

A MAPK também é inativa em oócitos em VG e torna-se ativa com a retomada da meiose, levemente após o MPF, apresentando um aumento gradual na sua atividade até 12-14 horas e se mantém estável até o final da maturação, sugerindo que a MAPK não é exigida para a retomada da meiose,

mas é essencial em eventos pós-rompimento da vesícula germinativa (KUBELKA et al., 2000).

No entanto ao contrário do MPF, a MAPK se mantém elevada durante a transição de meiose I à meiose II. A MAPK está envolvida na dinâmica dos microtúbulos que são responsáveis pelo deslocamento da cromatina para a periferia e a reorganização das organelas no citoplasma do oócito (VERLHAC et al., 1994). De acordo com Gordo et al., (2001), enquanto o MPF estaria relacionado à retomada da meiose, a MAPK estaria relacionada com o segundo bloqueio meiótico em metáfase II, manutenção dos níveis elevados de MPF durante essa fase e organização do fuso meiótico.

3.3. O óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso envolvido em diversos processos fisiológicos em mamíferos, é sintetizado a partir de cofatores e da oxidação da L-arginina que resulta em L-citrulina e NO (IGNARRO et al., 1987; RETTORI; MCCANN, 1998). O efeito do NO em células é dubio e dependente da sua concentração, onde em células somáticas, altas concentrações de NO são citotóxicas (MESSMER; LAPETINA; BRUNE, 1995) e em baixas concentrações são protetoras contra espécies reativas de oxigênio (KUO; ABE, 1996).

A síntese do NO é catalisada pela enzima óxido nítrico síntese (NOS), que pode ser encontrada em três isoformas distintas: a isoforma constitutiva neural (nNOS ou NOSI), constitutiva endotelial (eNOS ou NOSIII) e induzível (iNOS ou NOSII) (FURCHGOTT, 1999; IGNARRO et al., 1999; NATHAN; XIE, 1994).

As isoformas NOSI e NOSIII são constitutivas dependentes de cálcio (Ca^{+}) e calmodulina (CaM) e estas isoformas produzem NO em baixas quantidades em curtos períodos de tempo (THOMAS; ARMSTRONG; GILCHRIST, 2004). A isoforma NOSII por sua vez é uma isoforma induzível, sua ativação é independente de cálcio e tem a capacidade de sintetizar

grandes quantidades de NO por períodos mais longos quando comparada às isoformas constitutivas (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

3.3.1. O óxido nítrico na maturação

A enzima NOSIII já foi detectada em oócitos de ratas (JABLONKA-SHARIFF; BASURAY; OLSON, 1999; JABLONKA-SHARIFF; OLSON, 1997), porcos (HATTORI et al., 2000) e em bovinos (REYES; VAZQUEZ; DELGADO, 2004; TESFAYE et al., 2006). A isoforma NOSII foi detectada também em oócitos de camundongos (NISHIKIMI et al., 2001). Em oócitos e embriões de bovinos também já se foi detectado RNAm das enzimas NOSII e NOSIII e a proteína NOSIII (PIRES et al., 2009; TESFAYE et al., 2006).

O NO tem a capacidade de modular e influenciar processos como a foliculogênese, esteroidogênese, ovulação, maturação do oócito e o desenvolvimento embrionário (ROSSELLI; KELLER; DUBEY, 1998; THALER; EPEL, 2003).

Segundo Bu et al.,(2003, 2004), o efeito do NO na maturação de oócitos de camundongos pode ser estimulatório ou inibitório dependendo de sua concentração. Em oócitos de ratos e camundongos, altas concentrações de NO causam o bloqueio da maturação (JABLONKA-SHARIFF; OLSON, 1998, 2000; JABLONKA-SHARIFF et al., 1999). Em suínos e camundongos com baixas concentrações o NO ocorre um estímulo a maturação oocitária em condições *in vitro* (BU et al., 2004; TAO et al., 2005).

Em camundongos, o NO também está envolvido na regulação do desenvolvimento folicular, no desenvolvimento embrionário, na pré-implantação e na apoptose (MITCHELL; KENNEDY; HARTSHORNE, 2004; SENGOKU et al., 2001; TRANGUCH; STEUERWALD; HUET-HUDSON, 2003).

Em bovinos, Tessaro et al., (2011) sugerem que em ovários com um número pequeno de folículos antrais, ocorre uma falha no sistema NOSI/NO, podendo estar relacionado a uma reduzida vascularização do folículo, podendo

afetar assim a qualidade do oócito, induzindo à uma queda prematura de fertilidade.

Nesta espécie, poucos estudos relatam o papel do sistema NOS/NO e seus efeitos na reprodução. No entanto, já se sabe que as células da granulosa de folículos menores a produção de NO é maior quando comparada com a síntese das células de folículos maiores (BASINI et al., 1998). Em recentes estudos feitos a partir da expressão gênica em oócitos de embriões bovinos, foi relatada uma intensa e complexa interação entre as três isoformas das enzimas NOS (BILODEAU-GOESEELS, 2007; TESFAYE et al., 2006; VIANA et al., 2007).

3.4. Os nucleotídeos cíclicos

Monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), é um nucleotídeo cíclico derivado da guanosina trifosfato (GTP), esta transformação é feita pela enzima guanilato ciclase solúvel (GCs). Este nucleotídeo é um mensageiro secundário, sua síntese é induzida pelo NO ou por peptídeos natriuréticos (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Sua via de ação mais comum envolve a ativação da proteína cinase dependente de GMPc (PKG) e atividade sobre algumas das enzimas da família das fosfodiesterases (PDE) (DENNINGER; MARLETTA, 1999).

As proteínas da família PKG (PKG I e PKG II) que são ativadas pela ação do GMPc, fosforilam alguns substratos específicos na célula, influenciando em suas atividades e conduzindo a uma série de efeitos (VACCARI et al., 2009). A PKG I, modula a regulação da expressão gênica e nível de proteínas (FRANCIS et al., 2010) e a PKG II atua na fosforilação de substratos relacionados à processos ovulatórios (SRIRAMAN et al., 2006).

O GMPc atua como um segundo mensageiro assim como o AMP cíclico, mais notavelmente por ativar as proteínas cinases intracelulares em resposta à ligação de hormônios peptídeos à membrana celular.

A adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) é uma molécula importante na transdução de sinal em uma célula. Este nucleotídeo cíclico é sintetizado pela enzima adenilato ciclase (AC), em uma reação onde ocorre a lise da ATP-pirofosfato se convertendo em AMPc e pirofosfato.

Os níveis de AMPc influenciam a atividade da proteína quinase A (PKA), em níveis elevados deste nucleotídeo a PKA se mantém ativa, causando a fosforilação de resíduos de serina ou treonina no MPF, causando a sua inativação (SIRARD; RICHARD; MAYES, 1998).

3.4.1. GMPc e AMPc na maturação

Para que ocorra a retomada da meiose durante a maturação após o pico de LH, é necessário que o oócito estoque um nível de proteínas do grupo MPF, como a cinase dependente de ciclina (CDK1) e ciclinas (KANATSU-SHINOHARA; SCHULTZ; KOPF, 2000). Além da necessidade de estocar estas proteínas, a retomada da meiose é gerida pelos níveis de um nucleotídeo cíclico dentro do oócito, o AMPc.

Em concentrações elevadas o AMPc tem a competência de bloquear o desenvolvimento meiótico. Um mecanismo de manter estes níveis elevados é a passagem de AMPc sintetizado pelas células do *cumulus* para o oócito via *gap junctions* contribuindo para a manutenção de altos níveis de AMPc no oócito, mantendo este em bloqueio meiótico (WEBB et al., 2002). No entanto, este mecanismo é limitado pois as *gap junctions* tem seu canal bloqueado após o pico da gonadotrofina (NORRIS et al., 2008).

Outro mecanismo para a manutenção elevada deste nucleotídeo é a capacidade do próprio oócito sintetizar AMP. Kuyt et al., (1988) detectaram a enzima sintetizadora na membrana plasmática de oócitos bovinos, local onde o oócito poderia gerar níveis de AMPc.

Com a queda dos níveis de AMPc a PKA diminui sua atividade de fosforilação do substrato, tornando-se inativa. Com sua inativação em oócitos a

fosfatase CDC25B se torna ativa (SOLC et al., 2008), esta que vai desfosforilar a CDK1, a subunidade catalítica do MPF, induzindo a retomada da meiose (HAN; CONTI, 2006).

Alguns estudos indicam, que com a influencia do NO causando o aumento dos níveis de GMPc, ocorre a manutenção do bloqueio meiótico no estágio diplóteno da prófase I, e o fato contrário, com a diminuição dos níveis de NO, resulta na redução dos níveis de GMPc, induzindo a retomada meiótica (ZHANG et al., 2007).

3.5. As fosfodiesterases e a maturação

Além das enzimas que sintetizam os nucleotídeos cíclicos, outro fator que interfere nestes níveis são as fosfodiesterases (PDEs). As fosfodiesterases são enzimas intracelulares que catalisam a hidrólise da ligação fosfato cíclico do AMPc e GMPc para gerar os produtos 5'-AMP e 5'-GMP, que são inativos nas respectivas vias de sinalização dos nucleotídeos cíclicos (FRANCIS; BLOUNT; CORBIN, 2011).

São encontrados 23 genes de PDEs em mamíferos e estão divididos em 11 famílias de acordos com várias propriedades (figura 3), como substratos específicos, atividade reguladora, homologia e características catalíticas.

PDEs específicas de AMPc	PDEs de dupla especificidade	PDEs específicas de GMPc
	PDE1	
PDE4	PDE2	PDE5
PDE7	PDE3	PDE6
PDE8	PDE10	PDE9
	PDE11	

Figura 3. Representação das 11 famílias de fosfodiesterases classificadas pela sua especificidade entre os nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc.

As atividades das PDEs são moduladas em coordenação com adenilato ciclase, guanilato ciclase e níveis de AMPc e GMPc. Segundo Norris et. al. (2009), no interior das células da granulosa do folículo ovariano é sintetizado o GMPc, este nucleotídeo migra para o oócito através das *gap junctions* inibindo a degradação do AMPc causada pela PDE3A, mantendo os níveis deste nucleotídeo elevados para a manutenção do bloqueio da meiose, resultando em um *cross-talk* entre as vias do GMPc/AMPc (figura 4).

Figura 4. Modelo hipotético gráfico do cross-talk entre o GMPc sintetizado nas células da granulosa que migram através das gap junctions para o oócito, interferindo na atividade da PDE3A.

As PDEs estão envolvidas na maturação de oócitos por diminuir os altos níveis de AMPc do oócitos imaturos de forma a permitir o reinício da meiose, e consequentemente, o início da maturação do oócito (SADLER; MALLER, 1989).

Tsafiri et al., (1996) utilizando ratas como modelo experimental descreveram que a localização da PDE3A é restrita ao oócito, enquanto a PDE4D foi detectada nas células da granulosa/cumulus, e ainda relataram a prevenção da retomada espontânea da meiose utilizando inibidores específicos para família da PDE3. Outros trabalhos realizados com inibidores para família da PDE3 também relatam a manutenção do bloqueio meiótico durante a maturação *in vitro* em porcos (LAFOREST et al., 2005), camundongos (NOGUEIRA et al., 2003) e bovinos (MAYES; SIRARD, 2002).

A isoforma PDE3A é a que prevalece em oócitos e sua atividade favorece a retomada da meiose, tanto na maturação espontânea como na induzida por gonadotrofinas (RICHARD; TSAFRIRI; CONTI, 2001). Em outros experimentos Masciarelli et al., (2004) descreveram que a atividade da PDE3A foi aumentada depois do estímulo dado por gonadotrofina, antes do rompimento da vesícula germinativa.

Sasseville et al., (2009a) foram os primeiros a relatar e descrever o papel funcional da PDE8 em ovários de mamíferos, experimentos com bovinos descreveram a detecção da PDE3A e PDE8A em oócitos, PDE8A PDE8B e PDE10A em células do cumulus e PDE8A nas células da granulosa.

Segundo Wang et al., (2008) após a detecção da PDE5 em oócitos e células do cumulus de camundongos, estes sugerem que a atividade da PDE5 desempenha um papel fundamental na regulação da maturação espontânea dos oócitos, implicando em uma interferência nos níveis de GMPc e AMPc.

A PDE5 catalisa exclusivamente a degradação do GMPc, contrabalançando a produção deste pela GCs (WANG et al., 2008). Assim a inibição da PDE5 aumenta os níveis intracelulares do GMPc e inicia uma cascata de reações, como o estímulo da atividade da PDE2 (MARTINS; MUMBY; BEAVO, 1982) ou a inibição da atividade da PDE3 (JUILFS et al., 1999).

A deficiência de alguma isoforma de PDE causa infertilidade devido à incapacidade do oócito retomar a meiose, demonstrando sua importância fisiológica na reprodução em ratas (WANG; SHI, 2007).

4. Material e métodos

4.1. Local de execução do projeto

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Citologia do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e

Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Pirassununga-SP.

4.2. Reagentes e meios de cultivo

Exceto quando mencionado, os reagentes e meios de cultivo foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

4.3. Obtenção de complexos cumulus-oócitos (CCOs)

Ovários foram obtidos em abatedouros, logo após o abate dos animais, e levados ao laboratório em solução salina a 30° C. Para obtenção de complexos cumulus-oócitos (CCOs), os ovários foram lavados em solução salina estéril e tiveram seus folículos de 2-8 mm de diâmetro aspirados com auxílio de uma agulha 18 G acoplada a uma seringa de 10mL. O material aspirado foi colocado em um tubo cônico de 50mL e mantido em repouso para decantação por 5 minutos. A porção superior do líquido folicular foi transferida para dois tubos cônicos de 15mL e estes foram submetidos à centrifugação a 3000x g por 1,5 minutos para que o líquido centrifugado fosse utilizado na seleção dos CCOs. O pellet do tubo cônico de 50mL e o líquido folicular centrifugado dos tubos cônicos de 15mL foram então transferidos na proporção de 1:5, respectivamente, para placas de Petri de 100 mm para busca e classificação dos CCOs sob microscópio estereoscópico. Foram selecionados para os experimentos somente CCOs com cumulus compacto de pelo menos 3-4 camadas de células da granulosa e oócitos com citoplasma uniforme.

4.4. Maturação *in vitro*

Os CCOs selecionados foram cultivados em gotas de 100 µL (20-25 CCOs por gota) de meio de maturação sob óleo mineral. O cultivo dos CCOs foi realizado por até 9 horas em estufa a 38,5° C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar e máxima umidade.

4.4.1. Meios de maturação

O meio de maturação era constituído por:

- meio de maturação (controle): TCM-199 acrescido de bicarbonato (0,22mg/mL), 0,1% de PVA (álcool polivinílico), piruvato de sódio (0,25 mM) e gentamicina (10 µg/mL);
- tratamento SNAP: meio de maturação controle + 10^{-7} M de SNAP (SCHWARZ, 2011)(S-nitroso-N-acetylpenicillamine, doador de óxido nítrico, Calbiochem);
- tratamento SNAP+ODQ: tratamento SNAP + 10^{-5} M de ODQ (BILODEAU-GOESEELS, 2007)(1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3a] quinoxaline-1-one, inibidor da guanilato ciclase, Biomol);
- tratamento SNAP+SIL: tratamento SNAP + 10 µM de Sildenafil (SCHWARZ et al., 2013)(Sildenafil, inibidor da PDE5, Santa Cruz Biotechnology);
- tratamento SNAP+CIL: tratamento SNAP + 20 µM de Cilostamide (MAYES; SIRARD, 2002)(Cilostamide, inibidor da PDE3, Enzo Life Sciences);
- tratamento SNAP+DIP: tratamento SNAP + 50 µM de Dipyridamole (SASSEVILLE et al., 2009b)(Dipyridamole, inibidor da PDE8, Enzo Life Sciences);

4.5. Determinação do estágio da meiose

4.5.1. Imunofluorescência (anti-lamina A/C)

Para determinação do estágio da meiose, os CCOs foram desnudos para a separação do oócito das células do cumulus. O desnudamento foi realizado por agitação no vortex durante 5min em tubo de 5mL com 0,3mL de PBS livre de cálcio e magnésio acrescido de 0,1% de PVP (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os oócitos desnudos foram fixados em 4% de paraformaldeído em

PBS (24-48h) e depois permeabilizados em Triton X-100 0,5% (USB Corporation, OH – USA) e Tween20 0,05% (USB Corporation, OH – USA) em PBS por 30min. Após a permeabilização os oócitos foram transferidos para uma solução de bloqueio (PBS + 2% BSA) por 60min e em seguida incubados com o anticorpo primário [anti-lamina A/C, 1:100; Santa Cruz Biotechnology] por 60min. Posteriormente, os oócitos foram lavados em PBS e depois mantidos em solução de bloqueio + anticorpo secundário [anti-IgG de coelho conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) 1:200; Santa Cruz Biotechnology] por 60 min protegidos da luz. Os oócitos foram lavados novamente em PBS e transferidos para uma gota de 10µL de Vectashield com DAPI (Vector Laboratories, CA, USA), as lâminas com os oócitos foram montadas com lamínulas e analisadas em microscópio de epifluorescência (excitação 485 nm para FITC e 350nm para DAPI). Oócitos apresentando marcação verde do FITC (detecção da lamina A/C do envelope nuclear) foram considerados imaturos em estágio de vesícula germinativa (VG). Oócitos sem a presença do envelope nuclear foram considerados como tendo passado pelo processo de rompimento da vesícula germinativa (RVG), portanto, reiniciado a meiose (retomada da maturação). A marcação em azul (DAPI) permite visualizar a cromatina e confirmar a localização do núcleo/cromossomos. A partir do total de oócitos maturados *in vitro* foi determinada a proporção (%) de oócitos em VG e que retomaram a meiose (RVG).

4.5.2. Coloração com orceína

Os oócitos foram desnudados como descrito e depois montados entre lâmina e lamínula, estas foram mantidas em uma solução de fixação (álcool etílico + álcool acético 3:1, Synth) durante 24-48h. Após a fixação, as lâminas foram banhadas com a solução de coloração de orceína (água milliQ + ácido acético (3:2) + 2% de orceína) durante 1min. Após o banho com a coloração de orceína as lâminas foram lavadas com a própria solução de fixação e observadas em microscópio de contraste de fase (Zeiss, Alemanha) para

determinação da porcentagem de oócitos imaturos (VG, presença do envelope nuclear) e que retomaram a meiose (RVG).

4.6. Mensuração dos níveis de óxido nítrico (Método de Griess)

Para a determinação dos níveis de óxido nítrico foi utilizada a quantificação de nitrato pelo método de Griess. Para a execução do método, foram coletados os meios de cultivo de maturação *in vitro* dos CCOs avaliados para a determinação do estágio da meiose. Foram utilizados 100uL dos meios de maturação de cada tratamento. Os meios foram armazenados em microtubos de 600 uL e mantidos a -20°C até serem submetidos aos ensaios. Os ensaios foram realizados com o Kit Griess Reagent System (Promega), seguindo as instruções do fabricante. A leitura da absorbância foi feita a 546 nm. Para determinação das concentrações de nitrito das amostras, uma curva padrão foi feita juntamente com as amostras do experimento, para que as mesmas fossem calculadas pela equação da curva padrão.

4.7. Mensuração dos níveis dos nucleotídeos AMPc e GMPc.

A mensuração dos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc foram realizados pelo método de imunensaio enzimático (EIA), com *pools* de 10 e 40 CCOs, respectivamente para cada nucleotídeo, como realizado nos experimentos de BILODEAU-GOESEELS (2007), tomando-se o cuidado de que o tamanho e as camadas de células do cumulus em torno dos oócitos fossem de tamanhos similares. Após a maturação, os oócitos foram transferidos para um tubo eppendorf com 200 µL de 0,1N HCl. As células sofreram um processo de lise por 20 min e foram centrifugadas a 12.000x g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos eppendorfs e armazenados a -20° C até serem submetidos aos ensaios de acordo com as instruções dos respectivos kits (EIA GMPc e EIA AMPc, Format A PLUS, Biomol).

4.8. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o sistema SAS (V9.0; SAS Institute, Inc., Cary, NC). As porcentagens da determinação do estágio de meiose foram transformados em arco-seno. A determinação do estágio de meiose e a concentração de óxido nítrico foram analisadas por ANOVA “one-way”, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Os efeitos dos tratamentos sobre os níveis de GMPc e AMPc foram analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Diferenças com probabilidade de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Todos os experimentos foram repetidos de 4 a 6 vezes.

4.9. Delineamento experimental

4.9.1. Experimento 1: O efeito do SNAP no cultivo de oócitos bovinos maturados *in vitro* nas taxas de retomada da meiose e níveis de NO.

Esse experimento teve por objetivo determinar o efeito do aumento da disponibilidade de NO sobre a retomada da meiose e ainda determinar se o efeito observado era dependente da ativação da via guanilato ciclase solúvel (GCs). Foi feita ainda a mensuração dos níveis de nitrato para confirmar que o tratamento com o doador de NO (SNAP) estava de fato elevando a disponibilidade do mesmo durante o cultivo.

Para esse experimento, os CCOs foram maturados em: 1) meio de maturação (controle), 2) meio de maturação SNAP (SCHWARZ et al., 2010) e 3) meio de maturação SNAP+ODQ (BILODEAU-GOESEELS, 2007). O cultivo foi realizado por 9 horas. Os oócitos foram desnudados e avaliados para o estágio da meiose (tratamentos controle, SNAP e SNAP+ODQ) e o meio de cultivo foi utilizado para a mensuração de óxido nítrico (tratamentos controle e SNAP).

4.9.2. Experimento 2: O efeito do SNAP no cultivo de oócitos bovinos maturados *in vitro* para os níveis de GMPc e AMPc.

Nesse experimento, buscou-se determinar se o aumento de NO afetaria os níveis dos nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc) e se o efeito é dependente de GCs.

Para tanto, os CCOs foram maturados em: 1) meio de maturação (controle); 2) meio de maturação SNAP; 3) meio de maturação SNAP+ODQ. Os CCOs foram coletados com 0, 1, 2 e 3 horas de cultivo para as análises dos nucleotídeos. As avaliações de GMPc e AMPc foram analisadas independentemente.

4.9.3. Experimento 3: O efeito do SNAP associado a inibidor da PDE5 na maturação *in vitro* de oócitos bovinos para os níveis de GMPc.

Neste experimento, buscou-se determinar se associação de SNAP ao sildenafil, um inibidor da fosfodiesterase 5 (PDE5, específica para hidrólise do GMPc), contribuiria para um aumento adicional nos níveis de GMPc.

Os CCOs foram maturados em: 1) meio de maturação (controle), 2) meio de maturação SNAP; 3) meio de maturação SNAP+SIL, (SCHWARZ et al., 2013). O cultivo transcorreu por 1 hora para a coleta de amostras para a avaliação dos níveis de GMPc nos CCOs.

4.9.4. Experimento 4: O efeito do SNAP associado a diferentes inibidores de PDEs na maturação *in vitro* de oócitos bovinos para a retomada da meiose e níveis de AMPc.

Neste experimento, investigou-se a associação de SNAP e outros inibidores de PDEs específicas para AMPc (cilostamide para PDE3 e dipiridamole para PDE8) sobre a retomada da meiose e os níveis de AMPc.

Os CCOs foram maturados em: 1) meio de maturação (controle), 2) meio de maturação SNAP; 3) meio de maturação SNAP+SIL; 4) meio de maturação SNAP+CIL e 5) meio de maturação SNAP+DIP. O cultivo ocorreu por 9 horas para avaliação da taxa de RVG e 1 hora para a coleta de amostras para a avaliação dos níveis de AMPc.

5. Resultados

5.1. Experimento 1 - O efeito do SNAP no meio de cultivo de oócitos bovinos maturados *in vitro* para as taxas de retomada da meiose e níveis de NO.

5.1.1. Retomada da meiose

Neste experimento foi avaliado o efeito do doador de NO (SNAP) associado ou não ao inibidor de GCs (ODQ) adicionados aos meios de maturação para a retomada da meiose dos CCOs após 9 horas de cultivo *in vitro*.

Pode-se observar que o grupo maturado com o doador de NO neste intervalo de cultivo apresentou menor proporção de oócitos que retomaram a meiose (53% de RVG) em relação ao grupo controle (78%, $P < 0,05$) (tabela 1).

Tabela 1: Proporção de oócitos bovinos maturados *in vitro* que permaneceram imaturos (VG) e que apresentaram a retomada da meiose identificada pelo rompimento da vesícula germinativa (RVG) após 9 h de cultivo.

Tratamento	Oócitos	VG	RVG
	N	N (% $\pm$ DPM)	N (% $\pm$ DPM)
Controle	88	19 (21,6 $\pm$ 2,4) ^b	69 (78,4 $\pm$ 2,4) ^a
SNAP	103	48 (46,6 $\pm$ 1,2) ^a	55 (53,4 $\pm$ 1,2) ^b
SNAP+ODQ	94	25 (26,6 $\pm$ 6,3) ^b	69 (73,4 $\pm$ 6,3) ^a

^{a-b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$). Resultados de 4 repetições.

Por outro lado, a associação do ODQ com o SNAP reverteu o efeito do SNAP visto que esse grupo apresentou proporção de RVG (73%) mais elevada que o SNAP ($P<0,05$) e semelhante ao grupo controle não tratado (78%, $P>0,05$) (tabela 1). De forma paralela, o SNAP aumentou a proporção de oócitos ainda em VG após 9 h de MIV, indicando um retardo na retomada da meiose (47%, $P<0,05$), em comparação aos grupos controle (22%) e SNAP+ODQ (27%), que foram similares entre si ($P>0,05$) (tabela 1).

Desta forma, os dados sugerem que o SNAP provocou um retardo na retomada da meiose e que esse efeito foi dependente da ativação da GCs, pois sua inibição com o ODQ reverteu o efeito. Assim sendo, o efeito de NO em inibir a retomada da meiose depende da ação de NO em estimular a enzima GCs.

5.1.2. Níveis de óxido nítrico.

Os níveis de óxido nítrico foram avaliados indiretamente pelo método de Griess que quantifica os níveis de nitrato no meio de cultivo celular, resultantes da elevação do NO. Na figura 5 observa-se os resultados obtidos nos diferentes tratamentos após 9 h de MIV. O grupo controle apresentou níveis de $37,8 \pm 2,7 \mu\text{M}$ de nitrato e no grupo tratado com o doador de NO (SNAP), os níveis de nitrato foram elevados a $48,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ($P<0,05$), confirmando que o tratamento com $0,1 \mu\text{M}$ de SNAP foi capaz de elevar de forma significativa a disponibilidade de NO nas condições de cultivo avaliadas.

Figura 5. Concentrações de nitrato produzidos por CCOs bovinos maturados *in vitro* durante 9 horas sem (controle) ou com o doador de óxido nítrico SNAP. Resultados de 5 repetições.

Desta forma validou-se a concentração utilizada dos níveis de óxido nítrico durante o cultivo dos CCOs maturados *in vitro* para os experimentos realizados neste trabalho.

5.2. Experimento 2: O efeito do SNAP no cultivo de oócitos bovinos maturados *in vitro* para os níveis de GMPc e AMPc.

Neste experimento foi avaliado o efeito do doador de NO (SNAP) durante as primeiras horas de maturação *in vitro* nos níveis de GMPc e se sua ação é dependente da ação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs). Avaliou-se ainda se o tratamento também seria capaz de atuar sobre os níveis de AMPc.

Para todos os grupos analisados, o perfil da variação das concentrações do GMPc durante o cultivo foi semelhante, onde se observou uma diminuição nos níveis do nucleotídeo no decorrer do cultivo, havendo redução já na primeira hora de cultivo e chegando ao mínimo às 3 h de MIV (figura 6).

Figura 6. Variação temporal dos níveis de GMPc durante 0, 1, 2 e 3 horas de maturação *in vitro* em cada tratamento avaliado. ^{a-d} Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os tempos de cultivo ($P < 0,05$). Resultados 4 repetições.

Para o grupo imaturo (0 h), onde os CCOs foram coletados logo após a aspiração folicular, os níveis de GMPc foram os mais elevados (4,36 pmol/CCO, $P < 0,05$) em relação a todos os demais tempos de cultivo em todos os tratamentos avaliados. Após 1 h de cultivo os níveis de GMPc observados foram de 3,94 a 2,48 pmol/CCO, atingindo os valores mais baixos às 3 h (1,90 a 1,08 pmol/CCO).

Ao comparar os diferentes tratamentos em cada horário (figura 7), observa-se que o embora o grupo SNAP tenha sofrido uma diminuição nos

níveis de GMPc (3,94 pmol/CCO) em relação ao grupo imaturo (4,36 pmol/CCO, $P<0,05$) já na primeira hora de cultivo essa queda foi menos acentuada, visto que a concentração de GMPc foi superior ao grupo controle (3,03 pmol/CCO, $P<0,05$) e também ao grupo SNAP+ODQ (2,48 pmol/CCO, $P<0,05$). Este último, por sua vez, foi também inferior ($P<0,05$) ao grupo controle.

Figura 7. Representação gráfica dos níveis de GMPc durante 0, 1, 2 e 3 horas de maturação *in vitro* (^{a-f} letras maiúsculas representam a diferenças entre os tratamentos $P<0,05$). Resultados de 4 repetições.

Quando os CCOs foram analisados após 2 horas de cultivo, a diferença apresentada pelo grupo SNAP (2,38 pmol/CCO) não persistiu diante do grupo controle não tratado (2,47 pmol/CCO, $P>0,05$). No entanto, a diferença persistiu quando comparada ao grupo SNAP+ODQ (1,24 pmol/CCO) que foi o grupo com níveis mais baixos de GMPc ($P<0,05$) (figura 7).

As mensurações que foram obtidas para os grupos após 3 horas de cultivo, apresentaram um padrão similar ao observado após 2 horas. Ou seja, controle e SNAP tiveram níveis similares (1,79 e 1,90 pmol/CCO, respectivamente, $P>0,05$) e SNAP+ODQ apresentou os níveis mais baixos de GMPc (1,08 pmol/CCO, $P<0,05$) (figura 7).

Assim sendo, os resultados indicam que o tratamento com SNAP é capaz de manter, ao menos na primeira hora de maturação, níveis de GMPc mais elevados que o controle não tratado. Isto é, na primeira hora de maturação já ocorre uma queda nos níveis de GMPc e esta queda é amenizada pelo SNAP (elevação de NO). Por outro lado, a queda observada é acentuada pela associação do OQD, indicando que os maiores níveis de GMPc observados com o SNAP são devidos à sua síntese pela GCs. Os níveis de GMPc mantidos mais elevados por apenas uma hora adicional em relação ao controle, parecem ser suficientes para ocasionar um retardo na retomada da meiose observadas às 9 h de MIV (Experimento 1).

Como o GMPc é capaz de inibir a PDE3 e com isso elevar os níveis de AMPc, investigamos também os níveis de AMPc nos mesmos tratamentos. Os resultados podem ser observados nas figuras 8 e 9.

O perfil da variação das concentrações de AMPc ao longo das 3 h de cultivo foi similar em todos os tratamentos, mostrando uma queda acentuada dos níveis do nucleotídeo já na primeira hora e atingindo os menores níveis com 3 h (figura 8).

Figura 8. Variação temporal dos níveis de AMPc durante 0, 1, 2 e 3 horas de maturação *in vitro* em cada tratamento avaliado. ^{a-c} Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os tempos de cultivo ($P < 0,05$). Resultados de 4 repetições.

Para o grupo imaturo (0 h), os níveis de AMPc foram os mais elevados (1,06 pmol/CCO, $P < 0,05$) em relação aos demais tempos de cultivo em todos os tratamentos avaliados. Na primeira hora de cultivo os níveis de AMPc observados foram de 0,38 a 0,18 pmol/CCO, atingindo os menores valores com às 3 h de cultivo (0,026 a 0,008 pmol/CCO).

Quando comparado os diferentes tratamentos em cada horário (figura 9), observa-se que o tratamento SNAP não teve a capacidade de elevar as concentrações de AMPc dos CCOs submetidos ao cultivo durante 3 horas.

Figura 9. Representação gráfica dos níveis de AMPc durante 0, 1, 2 e 3 horas de maturação *in vitro* (* Indica diferença diante a todos os tratamentos, ^{a-c} letras minúsculas representam as diferenças entre os tratamentos em cada intervalo de tempo $P < 0,05$). Resultados 4 repetições.

Para os CCOs analisados após a primeira hora de cultivo, os grupos SNAP e SNAP+ODQ não se diferiram (0,25 e 0,18 pmol/CCO, respectivamente $P > 0,05$), no entanto, apresentaram uma queda mais acentuada ($P < 0,05$) do que a apresentada pelo grupo controle (0,38 pmol/CCO) (figura 9).

Quando os CCOs foram analisados após 2 horas de cultivo, a diferença apresentada pelos grupos SNAP e SNAP+ODQ (0,20 e 0,15 pmol/CCO, respectivamente $P > 0,05$) persistiu diante do grupo controle não tratado (0,31 pmol/CCO, $P < 0,05$).

As mensurações que foram obtidas para os grupos após 3 horas de cultivo, apresentaram um padrão diferente ao observado após 1 e 2 horas de cultivo. Ou seja, controle e SNAP tiveram níveis similares (0,026 e 0,015 pmol/CCO, respectivamente, $P > 0,05$) e SNAP+ODQ apresentou os níveis mais baixos de AMPc (0,008 pmol/CCO, $P < 0,05$) (figura 9).

5.3. Experimento 3: O efeito do SNAP associado a inibidor da PDE5 na maturação *in vitro* de oócitos bovinos para os níveis de GMPc.

Neste experimento foi avaliado o efeito do doador de NO (SNAP) associado ao inibidor de PDE5 (sildenafil) nos níveis de GMPc após 1 h de cultivo. Como referência foi avaliado o grupo imaturo (0 h).

O grupo imaturo, como esperado, apresentou os maiores níveis de GMPc (0,38 pmol/CCO), que foram superiores ao controle que apresentou 0,18 pmol/CCO ($P < 0,05$). O grupo SNAP foi similar ao grupo controle (0,21 pmol/COC, $P > 0,05$) e inferior ao imaturos ($P < 0,05$)(figura 10).

Figura 10. Representação gráfica dos níveis de GMPc durante 0 e 1 horas de maturação *in vitro* (^{a-b} letras maiúsculas representam as diferenças entre os tratamentos em cada intervalo de tempo $P < 0,05$). Resultados de 5 repetições.

Por outro lado, o grupo SNAP+SIL foi o que apresentou níveis mais elevados de GMPc (0,28 pmol/COC) e embora não tenha sido diferente dos demais grupos ($P > 0,05$) foi o único que manteve os níveis do nucleotídeo mais próximo e semelhante ao grupo imaturo ($P > 0,05$), amenizando a queda do GMPc (figura 11).

Figura 11. Representação gráfica da queda dos níveis de GMPc durante 0 e 1 horas de cultivo *in vitro* (^{a-b} letras maiúsculas representam as diferenças entre os tratamentos em cada intervalo de tempo $P < 0,05$). Resultados de 5 repetições.

5.4. Experimento 4: O efeito do SNAP associado a diferentes inibidores de PDEs na maturação *in vitro* de oócitos bovinos para a retomada da meiose e níveis de AMPc.

5.4.1. Retomada da meiose.

Neste experimento foram avaliadas as taxas de rompimento da vesícula germinativa de oócitos que foram maturados por 9 horas com o doador de óxido nítrico (SNAP) associado com diferentes inibidores de PDEs (tabela 2). Foram utilizados diferentes inibidores de fosfodiesterases, incluindo além do inibidor da PDE5 (GMPc específica), inibidores de PDEs AMPc específicas (cilostamide para PDE3 e dipiridamole para PDE8),

Tabela 2: Proporção de oócitos bovinos maturados *in vitro* em estágio de vesícula germinativa (VG) e que passaram pelo rompimento de vesícula germinativa (RVG) que foram cultivados com o doador de óxido nítrico associado a diferentes inibidores de fosfodiesterases.

Tratamento	Oócitos	VG	RVG
	N	N (% $\pm$ DPM)	N (% $\pm$ DPM)
CONTROLE	100	23 (22,9 $\pm$ 1,8 %) ^e	77 (77,1 $\pm$ 1,8 %) ^a
SNAP	95	62 (65,1 $\pm$ 9,2 %) ^b	33 (34,9 $\pm$ 9,2 %) ^d
SNAP + Sildenafil	96	56 (59,6 $\pm$ 8,2 %) ^c	40 (40,4 $\pm$ 8,2 %) ^c
SNAP + Cilostamide	101	76 (75,3 $\pm$ 2,8 %) ^a	25 (24,7 $\pm$ 2,8 %) ^e
SNAP + Dipiridamole	96	41 (43,1 $\pm$ 8,6 %) ^d	55 (56,9 $\pm$ 8,6 %) ^b

^{a-d} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos (P<0,05). Resultados de 4 repetições.

Quando as medias das taxas de rompimento de vesícula germinativa (RVG) foram comparadas entre os grupos analisadas foram detectadas diferenças significativas em diversos grupos.

O grupo controle foi o que apresentou a maior proporção de oócitos que reiniciaram a meiose (77,1 $\pm$ 1,8 % RVG) diferindo de todos os demais grupos (P>0,05). Todos os grupos tratados com SNAP apresentaram redução na retomada da meiose, mas com variações dependendo do inibidor de PDE associado. O grupo maturado somente com SNAP resultou em apenas 35% dos oócitos retomando a meiose, com um aumento paralelo dos oócitos permanecendo em VG (65%). Quando o SNAP foi associado ao inibidor de PDE5 (SNAP+SILD) houve um aumento na proporção de oócitos retomando a meiose, passando a 40% de RVG (P<0,05), mas que ainda foi inferior ao controle não tratado (P<0,05). Ao contrário, quando foi associado o inibidor de PDE3 (cilostamide) ao SNAP, houve queda adicional na proporção de oócitos retomando a meiose (25%, P<0,05) e incremento paralelo na proporção de oócitos permanecendo em VG após 9 h de MIV (75%). A associação do SNAP ao dipiridamole (inibidor da PDE8) também reduziu o efeito do SNAP,

provocando elevação na proporção de oócitos retomando a meiose (57%, $P<0,05$).

Assim sendo, o SNAP reduziu a proporção de oócitos retomando a meiose, mantendo-os em VG por mais tempo. No entanto, ao associá-lo a inibidor de PDE5 para uma aumento adicional de GMPc, o efeito foi parcialmente limitado. A associação do inibidor de PDE8 também teve esse tipo de efeito. A única associação que incrementou a ação do SNAP foi o inibidor de PDE3 (cilostamide).

Além da menor proporção de oócitos que retomaram a meiose, o tratamento SNAP+CIL apresentou uma característica diferente dos demais tratamentos, onde se observou a pouca condensação da cromatina nos oócitos em VG (figura 12), até menos que no grupo não tratado. Oócitos que romperam a VG nesse tratamento também se apresentavam menos condensados (ainda não em metáfase I) como nos outros grupos (figura 13). Essa observação sugere uma maturação mais lenta nesse tratamento.

Figura 12. Imagens representativas de oócitos que foram cultivados durante 9 horas e que se mantiveram em estado de vesícula germinativa. Grupo controle (A); Grupo SNAP+CIL (B).

Figura 13. Imagens representativas de oócitos que foram cultivados durante 9 horas que romperam a vesícula germinativa e estão em progressão ao estágio de metáfase I. Grupo controle (A); Grupo SNAP+CIL (B).

5.4.2. Níveis de AMPc.

Para determinar se os tratamentos com os inibidores de diferentes PDEs que estavam provocando retardo variável na retomada da meiose tinha relação com os níveis de AMPc, foi realizada a mensuração dos níveis no nucleotídeo nos mesmos tratamentos avaliados nas taxas da retomada da meiose.

Observou-se que após 1 h de MIV houve grande queda nos níveis de AMPc em todos os grupos avaliados em relação ao grupo imaturo (0,93 pmol/CCO, $P < 0,05$) (figura 14). O grupo SNAP apresentou média de $0,214 \pm 0,02$ pmol/COC, sendo inferior ao grupo 0 h ($P < 0,05$) e similar ao controle não tratado (0,126 pmol/CCO, $P > 0,05$). O grupo SNAP+SIL (0,095 pmol/COC) e o grupo SNAP+CIL (0,113 pmol/COC) foram semelhantes entre si e ao controle ($P > 0,05$), mas inferiores ao grupo SNAP ($P < 0,05$) (figura 14). O grupo SNAP+DIP (0,164 pmol/COC) não diferiu dos demais grupos ($P > 0,05$).

Figura 14. Níveis de AMPc de oócitos bovinos maturados *in vitro* com um doador de óxido nítrico associado a diferentes inibidores de fosfodiesterases, durante 0 e 1h de maturação (letras minúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos $P < 0,05$). Resultados 6 repetições.

Observa-se então que mesmo utilizando inibidores de fosfodiesterases específicos da PDE8 e PDE3 durante a primeira hora de cultivo, não foi possível alterar os níveis de AMPc e quando utilizado o inibidor da PDE5 para manutenção dos níveis do nucleotídeo GMPc, este também não foi eficaz na manutenção dos níveis de AMPc. Os resultados sugerem que o GMPc não atua sobre a via do AMPc e que mesmo havendo alterações na retomada da meiose, não houve paralelismo nos níveis de AMPc, ou seja, embora o AMPc tenha declinado de forma similar após 1 h em todos os grupos avaliados, houve redução na proporção de oócitos que retomaram a meiose em todos os tratamentos, mas a redução variou em relação ao tipo de inibidor de PDE utilizado. O tratamento SNAP+CIL provocou maior retardo na retomada da meiose, mas teve um dos menores níveis de AMPc, indicando que outros fatores estão envolvidos no controle da retomada da meiose.

6. Discussão

No presente estudo foram avaliados os efeitos do doador de NO e o envolvimento de componentes da via GCs/GMPc em tais efeitos, bem como a influência de diferentes fosfodiesterases sobre a retomada da meiose e os

níveis dos nucleotídeos cíclicos GMPc e AMPc em oócitos bovinos maturados *in vitro*.

Os oócitos bovinos submetidos à MIV com o doador de NO, tiveram a progressão da maturação meiótica afetada, onde se observou uma redução na proporção de oócitos que retomaram a meiose, com consequente aumento na proporção de oócitos que permaneceram em estágio de vesícula germinativa (imaturos). Essas observações indicam que a presença de NO (induzido com 10^{-7} M de SNAP) mantém os oócitos em bloqueio meiótico.

Os efeitos relatados de NO na maturação têm sido variados e dependentes da concentração usada de diferentes doadores. Bu et al., (2003), descreveram que complexos cumulus-oócitos de camundongos cultivados com o doador nitroprussiato de sódio (SNP) em concentrações mais baixas (10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} M) estimularam o processo da maturação meiótica, enquanto concentração mais alta (10^{-3} M) houve o retardo da quebra da vesícula germinativa. Efeito similar em oócitos bovinos também foi relatado por Bilodeau-Goeseels (2007), em que baixa concentração de SNP (10^{-9} M) estimulou o rompimento da vesícula germinativa e concentração mais alta (10^{-6} M) inibiu.

No presente estudo utilizamos 10^{-7} M de SNAP como relatado por Schwarz et al., (2014), e confirmamos as observações anteriores de que com essa concentração observa-se um retardo na retomada da meiose. Resultados similares utilizando outro doador de NO (SNP) e tempo de avaliação distinto (7 h de MIV) também foram descritos por Bilodeau-Goeseels (2007). Essas informações reforçam a ideia de que o incremento da disponibilidade de NO provoca a redução na proporção de oócitos que retomam a meiose, sugerindo a participação desse sinalizador na manutenção do bloqueio meiótico.

Uma outra explicação para a redução da proporção de oócitos retomando a meiose poderia ser o efeito tóxico de NO, visto que esse sinalizador também é mediador de efeitos de estresse oxidativo em células animais (DUBEY et al., 2011). Em camundongos, as taxas de embriões produzidos *in vitro* e as taxas de implantação de embriões *in vivo*, tiveram uma

influência negativa com o uso de doador de óxido nítrico (10^{-3} a 10^{-6} M de DETA - diethylenetriamine), provocado por um efeito tóxico da elevação de NO (BARROSO et al., 1998).

Este, porém, não parece ser o caso, já que com o decorrer da maturação as taxas de progressão da meiose até metáfase II (conclusão da maturação após 24 h de MIV) não se diferem de oócitos não tratados, demonstrando a reversibilidade do tratamento (BILODEAU-GOESEELS, 2007; BU et al., 2003; SCHWARZ, 2011; VIANA et al., 2007).

O retardo da meiose causado pelo uso de doadores de NO parece ser então proveniente de sua atuação em vias de sinalização envolvidas no controle da retomada da meiose. Sabe-se que uma das vias de sinalização influenciadas por NO envolve a ativação da GCs com consequente elevação dos níveis de GMPc (POTTER, 2011). A influência do GMPc no controle da maturação já foi observada em oócitos de ratas em que o declínio de seus níveis ocorrem em paralelo com a retomada da meiose e sua injeção inibe a maturação (TÖRNELL; BILLIG; HILLENSJÖ, 1990). Ainda em ratas, já foi observada a influência de NO na maturação e que tal efeito foi mediado por GMPc (NAKAMURA et al., 2002). Portanto, o NO pode atuar em vias que controlam a meiose.

Assim procuramos investigar se o efeito do NO observado era proveniente da ação da GCs/GMPc. Observou-se que quando o SNAP era associado ao inibidor de GCs (ODQ) houve uma reversão do efeito do SNAP, ou seja, o retardo da retomada da meiose não ocorreu e a proporção de oócitos que retomaram a meiose foi similar ao grupo controle. Assim, a via NO/GCs/GMPc é ativa no oócitos bovino e pode estar envolvida no controle da maturação de oócitos bovinos como descrito em camundongos (BU et al., 2004) e ratas (NAKAMURA et al., 2002; TÖRNELL; BILLIG; HILLENSJÖ, 1990).

No entanto, Bilodeau-Goesseels (2007) descreve resultados distintos para CCOs bovinos cultivados por 7 horas com um doador de NO (10^{-4} M de SNP) associado ao ODQ (10^{-4} - 10^{-6} M), onde o inibidor da GCs não conseguiu

reverter o efeito do doador de NO na retomada da meiose. As diferenças observadas entre este trabalho e o de Bilodeau-Goeseels (2007) poderiam ser devidas às condições de cultivo distintas (tipo e concentração do doador utilizado) ou ainda ao tempo de cultivo avaliado, onde a cinética de maturação difere em diferentes laboratórios. Em estudo semelhante, Schwarz (2011) usaram 10^{-7} M de SNAP por 7 h e também não obtiveram efeito sobre a retomada da meiose, como descrito por Bilodeau-Goeseels (2007), porém quando a avaliação foi realizada após 9 h de MIV, o doador de NO provocou redução significativa na retomada da meiose como observado no presente estudo. Assim sendo, parece plausível a hipótese de que o NO mantém o oócito em bloqueio meiótico e que tal efeito se deve à ativação da enzima GCs.

Como a função da GCs é a síntese de GMPc foi feita também a avaliação do efeito do doador de NO sobre os níveis desse nucleotídeo cíclico, o qual também já foi relacionado com o controle da retomada da meiose.

Com a suplementação do meio de maturação com o doador de NO (SNAP) os níveis de GMPc se mantiveram elevados durante a primeira hora de maturação, mas quando o doador de NO era associado ao inibidor de GCs (ODQ), observou-se uma queda brusca logo na primeira hora de maturação, demonstrando que o aumento dos níveis de NO provoca a elevação dos níveis de GMPc e esse efeito é causado pela atividade da GCs.

A queda dos níveis do nucleotídeo GMPc nas primeiras horas de MIV corroboraram com as observações de outros estudo em bovinos (BILODEAU-GOEESELS, 2007; SCHWARZ et al., 2014), embora com cinéticas um pouco distintas. Em nosso estudo e no de Schwarz et al., (2014) o GMPc se manteve mais elevado na primeira hora, mas caiu posteriormente (com 2 e 3 h no presente estudo e com 3 e 6 h no de Schwarz et al., 2014), enquanto no de Bilodeau-Goeseels (2007) os níveis de GMPc estavam elevados após 3 horas de maturação e declinaram somente com 6 h. Além disso, nesse estudo, o ODQ não reverteu o efeito de SNP sobre os níveis de GMPc como observado no presente estudo e no de Schwarz et al., (2014). Essas diferenças são provavelmente devidas a variações no cultivo (tipo e concentração de doador e

períodos de avaliação diferentes). De toda forma, os resultados mostram que o efeito de NO sobre a manutenção do bloqueio meiótico se dá pela ativação da GCs e elevação nos níveis de GMPc. A manutenção do bloqueio meiótico pelo NO pela via da GCs/GMPc também foi descrita em roedores (NAKAMURA et al., 2002; SELA-ABRAMOVICH et al., 2008).

Além disso, observamos que essa elevação mantida somente na primeira hora de cultivo é suficiente para causar um retardo na retomada da meiose observada após 9 h de MIV, mas não há descrições similares da relação temporal do GMPc e da retomada da meiose em oócitos bovinos. Em ratas, Törnell et al (1990) demonstraram que o GMPc declina com a maturação espontânea do oócito, tal como para o AMPc e que sua injeção inibe a meiose. Esses autores sugeriram que o GMPc, assim como o AMPc, está envolvido na regulação da meiose.

O mecanismo pelo qual o GMPc regula a meiose, poderia ser dado por sua atuação sobre os níveis de outro nucleotídeo cíclico, o AMPc. O GMPc é capaz de inibir a atividade da PDE3, responsável pela hidrólise do AMPc (LEROY et al., 1996). A PDE3, por sua vez, é a PDE que prevalece nos oócitos (CONTI et al., 2002; SASSEVILLE et al., 2006; SCHWARZ et al., 2014). Alguns estudos em roedores mostraram que o efeito da via NO/GCs/GMPc em regular a retomada da meiose foi oriundo da influência do GMPc na inibição da PDE3A, que levou à manutenção de altos níveis de AMPc e manutenção dos oócitos em VG (NORRIS et al., 2009; VACCARI et al., 2009). Desta forma, buscou-se avaliar se o mesmo mecanismo ocorre em bovinos avaliando-se o efeito dos mesmos tratamentos sobre os níveis de AMPc e a ação dessa via.

Quando foram analisados os resultados do nucleotídeo AMPc observou-se que os mesmos declinaram já na primeira hora de MIV e assim se mantiveram até o final do cultivo em todos os tratamentos (SNAP com ou sem ODQ). Essas observações foram semelhantes às relatadas por Schwarz et al., (2014), onde também se observou o declínio de AMPc na primeira hora de maturação, mantendo-se baixo nos períodos de 3 e 6 h (no presente estudo 2 e 3 h). Não foram encontrados estudos semelhantes em oócitos bovinos.

Com os resultados observados, pode-se sugerir que mesmo o doador de NO estando presente e elevando os níveis de GMPc durante o cultivo dos CCOs, este tratamento não foi capaz de influenciar os níveis de AMPc, embora tenha provocado o retardo da retomada da meiose. A ausência de efeito da via NO/GCs/GMPc pode ser um indicativo de que a via de sinalização de roedores difere daquela de bovinos como sugeridos por Bilodeau-Goesseels (2011), ou ainda, que os tratamentos tenham sido insuficientes para elevar os níveis de GMPc a concentrações e/ou por tempo suficiente para inibir a PDE3. De toda forma, ficou demonstrado que o GMPc também está envolvido no controle da meiose de oócitos bovinos. Vaccari et al., (2009), relatam que a sinalização dos nucleotídeos AMPc e GMPc podem cooperar para a manutenção do bloqueio meiótico do oócito e que uma redução em qualquer um dos nucleotídeos pode ser um sinal para a maturação meiótica.

Além de uma concentração de GMPc insuficiente para inibir da PDE3, também é possível que tenha havido a degradação do próprio nucleotídeo pela atividade das PDEs. A PDE5 é a isoforma responsável pela hidrólise de GMPc contribuindo para a redução de seus níveis (VACCARRI, 2009). Recentemente houve a identificação da PDE5 em oócitos bovinos (SCHWARZ et al., 2014), indicando que essa PDE poderia estar reduzindo os níveis de GMPc gerados por ação de NO/GCs. Assim, buscamos associar o SNAP com o inibidor desta isoforma (sildenafil) e avaliar seus efeitos sobre os níveis do nucleotídeo cíclico GMPc.

Mesmo utilizando o doador de NO (SNAP) para estimular a atividade da GCs associado ao inibidor da PDE5 (sildenafil) para reduzir a sua hidrólise, os níveis do nucleotídeo tiveram redução logo na primeira hora de MIV. Esta associação durante o cultivo foi capaz de manter os níveis de GMPc similares aos do grupo imaturo, normalmente mais elevados, no entanto, os níveis de GMPc não foram substancialmente elevados.

Schwarz et al., (2013) utilizaram diferentes concentrações de sildenafil (0,1 e 10 μ M) durante a MIV de bovinos e estes conseguiram elevar os níveis de GMPc em relação ao controle em ambas concentrações, onde as

mensurações foram realizadas após 11 e 24 horas de maturação. Utilizando camundongos como modelo experimental, Wang et al., (2008), não conseguiram elevar os níveis de GMPc de oócitos desnudos e células do *cumulus* após o cultivo até 4 horas utilizando o inibidor da PDE5 (sildenafil - 1 μ M). Embora sejam experimentos distintos, este trabalho e o realizado por Wang et al., (2008), o tempo de exposição dos oócitos e células do *cumulus* com o inibidor (1 hora neste experimento e 4 horas nos de Wang et al., (2008)) parece ser a causa da ineficiência do aumento das concentrações de GMPc nestas células durante os horários avaliados.

Outra hipótese levantada para os níveis de GMPc não terem sofrido um aumento em suas concentrações apesar dos tratamentos, poderia ser um efeito de feedback negativo na atividade da PDE5. O GMPc é capaz de ativar não só a própria PDE5 (VACCARI et al., 2009) como além disso pode também ativar a proteína cinase dependente de GMPc (PKG). A PKG fosforila e ativa a PDE5 (KOESLING et al., 2005; WILSON et al., 2008; WYATT et al., 1998). A fosforilação da PDE5 aumenta sua afinidade para o substrato, aumentando assim a hidrólise do GMPc. Sua fosforilação também aumenta a Vmax e sua afinidade por sítios alostéricos do GMPc (CORBIN et al., 2000; WYATT et al., 1998).

Em outros tipos celulares, como em plaquetas, a resposta do GMPc induzido pelo NO é caracterizada pela ativação da PDE5 causando a rápida diminuição do GMPc intracelular e a sua dessensibilização. Paralelamente à ativação, PDE5 é fosforilada pela PKG, aumentando a sensibilidade da PDE5 para cGMP (KOESLING et al., 2005). Este feedback pode regular a sensibilidade do mecanismo da sinalização NO/GMPc, e não possibilitar o aumento de sua concentração. Portanto, uma alternativa para neutralizar este mecanismo de feedback, seria a inclusão de um inibidor específico para a PKG ou ainda alterar as concentrações do inibidor de PDE5 (sildenafil).

Considerando que a síntese do AMPc é realizada no oócito e nas células do *cumulus* e que este nucleotídeo também está envolvido na manutenção do bloqueio meiótico (EPPIG; DOWNS, 1984), buscamos associar

ao SNAP também inibidores de PDEs específicas para reduzir a hidrólise de AMPc e evitar a queda de seus níveis nos CCOs como observado anteriormente. A hidrólise do AMPc também é realizada pela ação de fosfodiesterases específicas, sendo a PDE3 a que prevalece nos oócitos (TSAFRIRI et al., 1996) e a PDE8 em células do *cumulus* (SASSEVILLE et al., 2009a). Assim, associamos o SNAP também à Cilostamide (inibidor de PDE3) e ao Dipyridamole (inibidor de PDE8) para avaliar seus efeitos sobre o reinício da maturação e os níveis de AMPc.

Quando analisados os resultados para as taxas de retomada da meiose dos oócitos cultivados por 9 horas com o doador de óxido nítrico e os inibidores de fosfodiesterases, foi observado que todos os tratamentos com SNAP retardaram a retomada da meiose, mantendo uma maior porcentagem de oócitos em estágio de vesícula germinativa. A associação do SNAP com o inibidor da PDE3 (cilostamide) foi o mais eficaz, com uma maior porcentagem de oócitos em estágio de VG em relação ao SNAP isolado. A inibição da PDE8 e da PDE5 em associação ao SNAP reduziu sua eficiência.

Poucos estudos foram realizados descrevendo as funções da PDE5 e PDE8 em oócitos, mas Sasseville et al., (2009) relatam que oócitos bovinos cultivados *in vitro* utilizando inibidores de PDEs, mesmo aumentando as concentrações do inibidor da PDE8 (dipyridamole) no cultivo, não afetaram a proporção de oócitos que atingiram o estágio de metáfase II. Os autores ainda relatam a importância da contribuição fisiológica da PDE8, onde sua inibição pode afetar negativamente as funções das células cumulus, tais como a comunicação via *gap junctions*, sinalização celular, fornecimento de metabólitos para o oócito ou expansão do cumulus. Esse estudo não avaliou o efeito do dipyridamole sobre a retomada da meiose. Quando CCOs foram cultivados por 30 horas tratados com dipyridamole (50µM), estes apresentaram uma diminuição nas taxas de clivagem após sua fertilização quando comparado com as taxas do grupo controle. Com estes resultados, Sasseville et al., (2009) sugerem que embora PDE8 seja uma isoforma de PDE predominante nas células do cumulus, a sua inibição pela dipyridamole durante

toda a MIV não promove a maturação citoplasmática do oócitos e a capacidade de seu desenvolvimento.

Esperava-se que a associação do SNAP com o inibidor da PDE8 aumenta-se a proporção de oócitos em VG, pois os níveis de GMPc seriam elevados pela ação do SNAP e os níveis de AMPc pela inibição da hidrólise do nucleotídeo pela PDE8 nas células do cumulus, o que retardaria a retomada da meiose. Mas esta associação não se mostrou eficaz, sendo que sua proporção de CCOs em estágio de VG era maior que as obtidas para os CCOs cultivados somente com SNAP. Esses resultados e as observações de Sasseville et al (2009) indicam que a contribuição da PDE8 talvez seja mais importante para outras funções celulares relacionadas à maturação (como expansão do cumulus) e não para o controle da meiose.

Por outro lado, quando os CCOs foram maturados com o doador de NO associado ao inibidor de PDE3 (cilostamida) foram observadas as menores taxas de retomada de meiose após 9 horas de cultivo, portanto, aumentando a eficiência do efeito causado exclusivamente pelo SNAP.

Para oócitos de camundongos maturados *in vitro*, Vanhoutte et al., (2008), descreveram que diferentes concentrações de cilostamida (0,001 μ M - 10 μ M) nos meios de maturação onde acarretam em diferentes taxas de bloqueio, sendo dose-dependentes.

A utilização de inibidores da PDE3 durante a MIV com a finalidade de retardar a maturação nuclear espontânea tem sido relatada em diversas espécies como em camundongos (MASCIARELLI et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2003), bovinos (THOMAS; ARMSTRONG; GILCHRIST, 2004), humanos (SHU et al., 2008; VANHOUTTE et al., 2007). Este retardo na maturação nuclear espontânea tem sido relacionado à melhoria o desenvolvimento embrionário.

Em bovinos, Mayes e Sirard (2002), relatam que oócitos desnudos submetidos a MIV por 12 horas tratados com os inibidores de PDE3 milrinone e cilostamida (50 μ M e 20 μ M, respectivamente) mantiveram-se em estágio de vesícula germinativa, enquanto os oócitos desnudos tratados com o inibidor

rolipram (50 μ M) retomaram a meiose. Em outro estudo, Thomas et al., (2004), relataram que a inibição de PDEs que hidrolisam o AMPc durante a maturação do oócito melhorou o seu potencial de desenvolvimento, demonstrado pelo aumento da produção de blastocistos.

A capacidade de cilostamida e milrinone para inibir o reinício da meiose sugere que a inibição específica da fosfodiesterase PDE3 impede o reinício da meiose em oócitos bovinos (MAYES; SIRARD, 2002). Resultados similares também foram reportados em oócitos de ratas submetidos ao cultivo *in vitro* (TSAFRIRI et al., 1996) e *in vivo* (WIERSMA et al., 1998).

Assim, como o uso isolado de SNAP foi eficiente em ocasionar um retardo da meiose, sua associação com o cilostamida se mostrou mais eficiente, tornando-se o melhor tratamento para esta finalidade. Além da menor taxa de rompimento de vesícula germinativa, os oócitos maturados no tratamento SNAP com cilostamida ainda apresentavam uma característica distinta diante dos demais tratamentos. A cromatina era mais descondensada tanto para os oócitos em estágio de VG quanto para oócitos que já haviam passado pela RVG. Característica que indica uma maior lentidão na retomada e progressão meiótica, o que poderia melhorar a qualidade da maturação.

Este retardo na retomada da meiose causado pelo cilostamida pode estar relacionado à ação do AMPc, onde este causa a ativação da PKA, por sua vez, está inibe a atividade do fator de promoção da maturação (DOWNS, 2010). Além deste mecanismo bem caracterizado pela ação do AMPc, os presentes resultados sugerem que o AMPc pode estar envolvido no controle de fatores que controlam a modelagem da cromatina durante as fases iniciais do crescimento do oócito e na fase final do rompimento da vesícula germinativa. Esta hipótese também foi sugerida por Luciano et al., (2011), que relatam o efeito do tratamento com cilostamida (10 μ M) impedindo a condensação da cromatina.

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, apoiando e dando capacidade para os oócitos obterem sucesso no desenvolvimento embrionário (LUCIANO et al., 2011).

Os efeitos do inibidor específico de PDE3 (cilostamida) também foram relatados por Dieci, et al., (2013) sobre o desenvolvimento embrionário em suínos. Os CCOs foram submetidos à MIV por 48 horas, nas 24 horas iniciais os CCOs foram tratados com 1 μ M de cilostamida e depois deste período retornaram para o cultivo padrão. Após a MIV, os CCOs foram ativados partenogeneticamente onde a taxa de blastocistos eclodidos obtidos da MIV com cilostamida foi superior ao grupo controle. Neste contexto, Dieci, et al., (2013), trazem uma hipótese de que o atraso de 6 horas causado pelo cilostamida na retomada da meiose poderia explicar em parte, o aumento da qualidade dos oócitos.

É possível então que o tratamento com SNAP e cilostamida seja benéfico para melhorar a qualidade do oócito. Tal hipótese deverá ser testada futuramente.

Como foram observadas diferenças nas taxas de retomada de meiose entre os tratamentos analisados, buscou-se avaliar o efeito dos mesmos sobre os níveis de AMPc.

Ao analisar as concentrações de AMPc dos CCOs maturados por 1 hora com o doador de NO, foi notada uma queda acentuada em todos os grupos, indicando que os inibidores de PDEs usados não impediram a queda nos níveis de AMPc no início da maturação.

Surpreendentemente, o grupo SNAP com cilostamida que teve a maior inibição da retomada da meiose, também teve uma das menores concentrações de AMPc mesmo com o uso do inibidor de PDE3. É possível que o efeito do cilostamida tenha ocorrido em período posterior à primeira hora de MIV, onde um maior tempo de exposição do inibidor com os CCOs durante a MIV poderia então atenuar a progressão da meiose avaliada às 9 h de cultivo. Outra hipótese possível, seria que o efeito do cilostamida tenha ocorrido em um momento anterior à primeira hora de MIV, assim como o SNAP. Thomas et al., (2004), relatam o contraste dos efeitos do tratamento de

oócitos com produtos químicos que mantêm alto os níveis de AMPc observados em roedores e primatas com a maioria das espécies de ungulados (bovinos), onde estes agentes químicos exercem apenas um efeito transitório durante a retomada da meiose, o que poderia ser o caso observado no presente estudo.

Portanto, ao longo do estudo observou-se que a via NO/GCs/GMPc é ativa no retardo do rompimento da vesícula germinativa, mas não foi efetiva em alterar as concentrações de AMPc. Possivelmente outras vias possam estar envolvidas e contribuam para o controle da retomada da meiose.

Os resultados sugerem que os mecanismos envolvidos na maturação de oócitos bovinos cultivados *in vitro* são bastante complexos e que distintas vias de sinalização podem estar atuando simultaneamente nestes processos, requerendo novas investigações.

7. Conclusões

- A elevação da disponibilidade de NO provoca o retardo na retomada de meiose;
- O efeito sobre a meiose é dependente da atividade da GCs e consequentemente da elevação dos níveis de GMPc;
- A elevação do GMPc é transitória e rápida, mas suficiente para promover o retardo da retomada da meiose;
- O efeito do NO/GCs/GMPc não parece se dar sobre os níveis de AMPc nas condições estudadas;
- A associação do inibidor de PDE5 (GMPc específico) não incrementa o efeito do NO sobre os níveis de GMPc nas condições estudadas;
- A associação de inibidores de diferentes PDEs influenciam o efeito do NO podendo reduzir (inibidores de PDE5 e PDE8, GMPc específico e AMPc específico das células do cumulus, respectivamente) ou incrementar (inibidor de PDE3, AMPc específico do oócito) o efeito sobre

a retomada da meiose, mas tal efeito não é associado à manutenção dos níveis de AMPc;

8. Referências bibliográficas

AUSTIN, C. C. R.; SHORT, R. R. V. Oogenesis and ovulation. In Reproduction in Mammals. In: **Reproduction in Mammals: Germ cells and fertilization.**

Book 1. [s.l.] Cambridge University Press, 1982.

BARROSO, R. P. et al. Nitric oxide inhibits development of embryos and implantation in mice. **Mol Hum Reprod**, v. 4, n. 5, p. 503–507, 1998.

BASINI, G. et al. Is nitric oxide an autocrine modulator of bovine granulosa cell function?. **Reprod Fertil Dev**, v. 10, n. 6, p. 471–478, 1998.

BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of manipulating the nitric oxide/cyclic GMP pathway on bovine oocyte meiotic resumption in vitro. **Theriogenology**, v. 68, n. 5, p. 693–701, 2007.

BILODEAU-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. 734–43, 2011.

BU, S. et al. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. **Mol Cell Endocrinol**, v. 207, n. 1-2, p. 21–30, 2003.

BU, S. et al. Nitric oxide influences the maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes cultured in spontaneous maturation medium and hypoxanthine-supplemented medium through different signaling pathways. **Mol Cell Endocrinol**, v. 223, n. 1-2, p. 85–93, 2004.

CHATTERJEE, S. et al. Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase-III in reproductive organs of female rats during the oestrous cycle. **Histochem J**, v. 28, n. 10, p. 715–723, 1996.

COLLADO-FERNANDEZ, E.; PICTON, H. M.; DUMOLLARD, R. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. **The International journal of developmental biology**, v. 56, n. 10-12, p. 799–808, jan. 2012.

CONTI, M. et al. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Mol Cell Endocrinol**, v. 187, n. 1-2, p. 153–159, 2002.

CORBIN, J. D. et al. Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 267, n. 9, p. 2760–7, maio 2000.

DENNINGER, J. W.; MARLETTA, M. A. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. **Biochim Biophys Acta**, v. 1411, n. 2-3, p. 334–350, 1999.

DIECI, C. et al. The effect of cilostamide on gap junction communication dynamics, chromatin remodeling, and competence acquisition in pig oocytes following parthenogenetic activation and nuclear transfer. **Biology of reproduction**, v. 89, n. 3, p. 68, set. 2013.

DOWNS, S. M. Regulation of the G2/M transition in rodent oocytes. **Mol Reprod Dev**, v. 77, n. 7, p. 566–585, 2010.

DUBEY, P. K. et al. Influence of nitric oxide on in vitro growth, survival, steroidogenesis, and apoptosis of follicle stimulating hormone stimulated buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles. **J Vet Sci**, v. 12, n. 3, p. 257–265, 2011.

EPPIG, J. J.; DOWNS, S. M. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. **Biology of reproduction**, v. 30, p. 1–11, 1984.

FAIR, T. et al. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anat Embryol (Berl)**, v. 195, n. 4, p. 327–336, 1997.

FAIR, T. et al. Immunolocalization of Nucleolar Proteins During Bovine Oocyte Growth , Meiotic. **Biology of reproduction**, v. 64, p. 1516–1525, 2001.

FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836–848, 2009.

FRANCIS, S. H. et al. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. **Pharmacol Rev**, v. 62, n. 3, p. 525–563, 2010.

FRANCIS, S. H.; BLOUNT, M. A.; CORBIN, J. D. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. **Physiol Rev**, v. 91, n. 2, p. 651–690, 2011.

FURCHGOTT, R. F. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. **Biosci Rep**, v. 19, n. 4, p. 235–251, 1999.

GANDOLFI, T. A.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1255–1276, 2001.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Anim Reprod Sci**, v. 82-83, p. 431–446, 2004.

GORDO, A. C. et al. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. **Mol Reprod Dev**, v. 59, n. 1, p. 106–114, 2001.

GOREN, S.; DEKEL, N. Maintenance of meiotic arrest by a phosphorylated p34cdc2 is independent of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. **Biol Reprod**, v. 51, n. 5, p. 956–962, 1994.

HAN, S. J.; CONTI, M. New pathways from PKA to the Cdc2/cyclin B complex in oocytes: Wee1B as a potential PKA substrate. **Cell Cycle**, v. 5, n. 3, p. 227–231, 2006.

HATTORI, M. A. et al. FSH suppression of nitric oxide synthesis in porcine oocytes. **J Mol Endocrinol**, v. 24, n. 1, p. 65–73, 2000.

HAUGHIAN, J. M. et al. Relationships between FSH patterns and follicular dynamics and the temporal associations among hormones in natural and GnRH-induced gonadotropin surges in heifers. **Reproduction**, v. 127, n. 1, p. 23–33, 2004.

HYTTEL, P. et al. Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. **Journal of reproduction and fertility**, v. 78, n. 2, p. 615–25, nov. 1986.

HYTTEL, P. et al. Review Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Reproduction**, p. 21–30, 2001.

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 24, p. 9265–9269, 1987.

IGNARRO, L. J. et al. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 34, n. 6, p. 879–886, 1999.

JABLONKA-SHARIFF, A. et al. Abnormal estrous cyclicity after disruption of endothelial and inducible nitric oxide synthase in mice. **Biol Reprod**, v. 61, n. 1, p. 171–177, 1999.

JABLONKA-SHARIFF, A.; BASURAY, R.; OLSON, L. M. Inhibitors of nitric oxide synthase influence oocyte maturation in rats. **J Soc Gynecol Investig**, v. 6, n. 2, p. 95–101, 1999.

JABLONKA-SHARIFF, A.; OLSON, L. M. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. **Endocrinology**, v. 138, n. 1, p. 460–468, 1997.

JABLONKA-SHARIFF, A.; OLSON, L. M. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. **Endocrinology**, v. 139, n. 6, p. 2944–2954, 1998.

JABLONKA-SHARIFF, A.; OLSON, L. M. Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes in vitro. **Mol Reprod Dev**, v. 55, n. 4, p. 412–421, 2000.

JAGARLAMUDI, K.; RAJKOVIC, A. Oogenesis: Transcriptional regulators and mouse models. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 356, p. 31–9, 2011.

JONES, K. T. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. **Mol Hum Reprod**, v. 10, n. 1, p. 1–5, 2004.

JUILFS, D. M. et al. Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 135, p. 67–104, 1999.

JULATON, V. T. A.; PERA, R. A. R. NANOS3 function in human germ cell development. **Human Molecular Genetics**, v. 20, p. 2238–2250, 2011.

KANATSU-SHINOHARA, M.; SCHULTZ, R. M.; KOPF, G. S. Acquisition of meiotic competence in mouse oocytes: absolute amounts of p34(cdc2), cyclin B1, cdc25C, and wee1 in meiotically incompetent and competent oocytes. **Biol Reprod**, v. 63, n. 6, p. 1610–1616, 2000.

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

KLINE, D. **Current Topics in Developmental Biology Volume 50**. [s.l.] Elsevier, 2000. v. 50p. 125–154

KOESLING, D. et al. Negative feedback in NO/cGMP signalling. **Biochemical Society transactions**, v. 33, n. Pt 5, p. 1119–22, nov. 2005.

KRISHER, R. L.; BAVISTER, B. D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 103–114, 1998.

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

KUO, P. C.; ABE, K. Y. Nitric oxide-associated regulation of hepatocyte glutathione synthesis is a guanylyl cyclase-independent event. **Surgery**, v. 120, n. 2, p. 309–314, 1996.

KUYT, J. R.; KRUIP, T. A.; DE JONG-BRINK, M. Cytochemical localization of adenylate cyclase in bovine cumulus-oocyte complexes. **Exp Cell Res**, v. 174, n. 1, p. 139–145, 1988.

LAFOREST, M. F. et al. Fundamental significance of specific phosphodiesterases in the control of spontaneous meiotic resumption in porcine oocytes. **Mol Reprod Dev**, v. 70, n. 3, p. 361–372, 2005.

LEROY, M. J. et al. Characterization of two recombinant PDE3 (cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterase) isoforms, RcGIP1 and HcGIP2, expressed in NIH 3006 murine fibroblasts and Sf9 insect cells. **Biochemistry**, v. 35, p. 10194–10202, 1996.

LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; RBERTS, T. H.; HIRSCHBERG, K. Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 16, p. 557–589, 2000.

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, dez. 2011.

MARTINS, T. J.; MUMBY, M. C.; BEAVO, J. A. Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues. **The Journal of biological chemistry**, v. 257, p. 1973–1979, 1982.

MASCIARELLI, S. et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. **J Clin Invest**, v. 114, n. 2, p. 196–205, 2004.

MATTA, S. G. et al. Effect of inhibition of synthesis of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide by aminoguanidine on the in vitro maturation of oocyte-cumulus complexes of cattle. **Anim Reprod Sci**, v. 111, n. 2-4, p. 189–201, 2009.

MAYES, M. A.; SIRARD, M. A. Effect of type 3 and type 4 phosphodiesterase inhibitors on the maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest. **Biol Reprod**, v. 66, n. 1, p. 180–184, 2002.

MESSMER, U. K.; LAPETINA, E. G.; BRUNE, B. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is antagonized by protein kinase C- and protein kinase A-activating compounds. **Mol Pharmacol**, v. 47, n. 4, p. 757–765, 1995.

MITCHELL, L. M.; KENNEDY, C. R.; HARTSHORNE, G. M. Expression of nitric oxide synthase and effect of substrate manipulation of the nitric oxide pathway in mouse ovarian follicles. **Hum Reprod**, v. 19, n. 1, p. 30–40, 2004.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, p. 109–142, 1991.

MORENO, R. D.; SCHATTEN, G.; RAMALHO-SANTOS, J. Golgi apparatus dynamics during mouse oocyte in vitro maturation: effect of the membrane trafficking inhibitor brefeldin A. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 5, p. 1259–66, maio 2002.

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

NAKAMURA, Y. et al. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. **Biol Reprod**, v. 67, n. 5, p. 1588–1592, 2002.

NATHAN, C.; XIE, Q. W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **J Biol Chem**, v. 269, n. 19, p. 13725–13728, 1994.

NISHIKIMI, A. et al. Localization of nitric oxide synthase activity in unfertilized oocytes and fertilized embryos during preimplantation development in mice. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 957–963, 2001.

NOGUEIRA, D. et al. Effect of phosphodiesterase type 3 inhibitor on developmental competence of immature mouse oocytes in vitro. **Biol Reprod**, v. 69, n. 6, p. 2045–2052, 2003.

NORRIS, R. P. et al. Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. **Development**, v. 135, n. 19, p. 3229–3238, 2008.

NORRIS, R. P. et al. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development**, v. 136, n. 11, p. 1869–1878, 2009.

PAYNE, C.; SCHATTEN, G. Golgi dynamics during meiosis are distinct from mitosis and are coupled to endoplasmic reticulum dynamics until fertilization. **Developmental Biology**, v. 264, n. 1, p. 50–63, dez. 2003.

PICTON, H. M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology**, v. 55, p. 1193–1210, 2001.

PIRES, P. R. L. et al. Endothelial and inducible nitric oxide synthases in oocytes of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 116, p. 233–243, 2009.

POTTER, L. R. Guanylyl cyclase structure, function and regulation. **Cell Signal**, v. 23, n. 12, p. 1921–1926, 2011.

RETTORI, V.; MCCANN, S. M. Role of nitric oxide and alcohol on gonadotropin release in vitro and in vivo. **Ann N Y Acad Sci**, v. 840, p. 185–193, 1998.

REYES, R.; VAZQUEZ, M. L.; DELGADO, N. M. Detection and bioimaging of nitric oxide in bovine oocytes and sperm cells. **Arch Androl**, v. 50, n. 4, p. 303–309, 2004.

RICHARD, F. J.; TSAFRIRI, A.; CONTI, M. Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation. **Biol Reprod**, v. 65, n. 5, p. 1444–1451, 2001.

RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol Reprod Dev**, v. 61, n. 2, p. 234–248, 2002.

RODRIGUEZ, K. F.; FARIN, C. E. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. **Reproduction, fertility, and development**, v. 16, n. 1-2, p. 55–67, jan. 2004.

ROSSELLI, M.; KELLER, P. J.; DUBEY, R. K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. **Hum Reprod Update**, v. 4, n. 1, p. 3–24, 1998.

SADLER, S. E.; MALLER, J. L. A similar pool of cyclic AMP phosphodiesterase in *Xenopus* oocytes is stimulated by insulin, insulin-like growth factor 1, and [Val12,Thr59]Ha-ras protein. **J Biol Chem**, v. 264, n. 2, p. 856–861, 1989.

SASSEVILLE, M. et al. New insight into the role of phosphodiesterase 3A in porcine oocyte maturation. **BMC developmental biology**, v. 6, p. 47, 2006.

SASSEVILLE, M. et al. Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. **Biol Reprod**, v. 81, n. 2, p. 415–425, 2009a.

SASSEVILLE, M. et al. Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 2, p. 415–25, ago. 2009b.

SCHWARZ, K. R. L. et al. Consequences of Nitric Oxide Synthase Inhibition During Bovine Oocyte Maturation on Meiosis and Embryo Development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 1, p. 75–80, 2010.

SCHWARZ, K. R. L. **O óxido nítrico e os nucleotídeos cíclicos em oócitos bovinos maturados in vitro**. [s.l.] Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2011.

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, 20 nov. 2014.

SELA-ABRAMOVICH, S. et al. Inhibition of rat oocyte maturation and ovulation by nitric oxide: mechanism of action. **Biology of reproduction**, v. 78, n. 6, p. 1111–8, jun. 2008.

SENGOKU, K. et al. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro. **Mol Reprod Dev**, v. 58, n. 3, p. 262–268, 2001.

SESSA, W. C. et al. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. **Circ Res**, v. 74, n. 2, p. 349–353, 1994.

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, mar. 2008.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1241–1254, 2001.

SIRARD, M. A. et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126–136, 2006.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v. 49, n. 2, p. 483–497, 1998.

SOLC, P. et al. CDC25A phosphatase controls meiosis I progression in mouse oocytes. **Dev Biol**, v. 317, n. 1, p. 260–269, 2008.

SOYAL, S. M.; AMLEH, A.; DEAN, J. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. **Development Cambridge England**, v. 127, p. 4645–4654, 2000.

SRIRAMAN, V. et al. Cyclic guanosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase II is induced by luteinizing hormone and progesterone receptor-dependent mechanisms in granulosa cells and cumulus oocyte complexes of ovulating follicles. **Mol Endocrinol**, v. 20, n. 2, p. 348–361, 2006.

STOJKOVIC, M. et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biol Reprod**, v. 64, n. 3, p. 904–909, 2001.

TAIEB, F.; THIBIER, C.; JESSUS, C. On cyclins, oocytes, and eggs. **Mol Reprod Dev**, v. 48, n. 3, p. 397–411, 1997.

TAO, Y. et al. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on porcine oocyte meiotic maturation. **Zygote**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2005.

TESFAYE, D. et al. The effect of nitric oxide inhibition and temporal expression patterns of the mRNA and protein products of nitric oxide synthase genes during in vitro development of bovine pre-implantation embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 6, p. 501–509, 2006.

TESSARO, I. et al. The endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide system is involved in the defective quality of bovine oocytes from low mid-antral follicle count ovaries. **J Anim Sci**, v. 89, n. 8, p. 2389–2396, 2011.

THALER, C. D.; EPEL, D. Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: a little dab'll do ya. **Curr Pharm Des**, v. 9, n. 5, p. 399–409, 2003.

THOMAS, R. E. et al. Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during in vitro maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. **Biol Reprod**, v. 71, n. 4, p. 1142–1149, 2004.

THOMAS, R. E.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. **Biol Reprod**, v. 70, n. 3, p. 548–556, 2004.

TOMEK, W.; TORNER, H.; KANITZ, W. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. **Reproduction in domestic animals**, v. 37, n. 2, p. 86–91, abr. 2002.

TÖRNELL, J.; BILLIG, H.; HILLENSJÖ, 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 Physiologica Scandinavica**, v. 139, n. 3, p. 511–517, 1990.

TRANGUCH, S.; STEUERWALD, N.; HUET-HUDSON, Y. M. Nitric oxide synthase production and nitric oxide regulation of preimplantation embryo development. **Biol Reprod**, v. 68, n. 5, p. 1538–1544, 2003.

TSAFRIRI, A. et al. 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, n. 2, p. 393–402, 1996.

VACCARI, S. et al. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. **Biol Reprod**, v. 81, n. 3, p. 595–604, 2009.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717–51, 1 abr. 2005.

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.

VANHOUTTE, L. et al. Effect of temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor on morphological and functional aspects of in vitro matured mouse oocytes. **Molecular reproduction and development**, v. 75, n. 6, p. 1021–30, jun. 2008.

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, n. 4, p. 1017–1025, 1994.

VIANA, K. S. et al. Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the in vitro maturation of bovine oocytes. **Anim Reprod Sci**, v. 102, n. 3-4, p. 217–227, 2007.

WANG, S. et al. PDE5 modulates oocyte spontaneous maturation via cGMP-cAMP but not cGMP-PKG signaling. **Front Biosci**, v. 13, n. 5, p. 7087–7095, 2008.

WANG, Z.; SHI, F. Phosphodiesterase 4 and compartmentalization of cyclic AMP signaling. **Chinese Science Bulletin**, v. 52, n. 1, p. 34–46, 2007.

WARD, F. et al. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. **Theriogenology**, v. 57, n. 8, p. 2105–2117, 2002.

WEBB, R. J. et al. Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in [cAMP] and protein kinase a in mammalian oocytes. **Dev Biol**, v. 246, n. 2, p. 441–454, 2002.

WESSEL, G. M. et al. The biology of cortical granules. **Int Rev Cytol**, v. 209, p. 117–206, 2001.

WESSEL, G. M.; CONNER, S. D.; BERG, L. Cortical granule translocation is microfilament mediated and linked to meiotic maturation in the sea urchin oocyte. **Development**, v. 129, n. 18, p. 4315–4325, 2002.

WHITWORTH, K. et al. Developmental expression of 2489 gene clusters during pig embryogenesis: an expressed sequence tag project. **Biol Reprod**, v. 71, n. 4, p. 1230–1243, 2004.

WIEMER, K. E. et al. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. **Mol Reprod Dev**, v. 30, n. 4, p. 330–338, 1991.

WIERSMA, A. et al. Phosphodiesterase 3 inhibitors suppress oocyte maturation and consequent pregnancy without affecting ovulation and cyclicity in rodents. **The Journal of clinical investigation**, v. 102, p. 532–537, 1998.

WILSON, L. S. et al. Compartmentation and compartment-specific regulation of PDE5 by protein kinase G allows selective cGMP-mediated regulation of platelet functions. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 36, p. 13650–5, 2008.

WYATT, T. A et al. ANF elicits phosphorylation of the cGMP phosphodiesterase in vascular smooth muscle cells. **The American journal of physiology**, v. 274, n. 2 Pt 2, p. H448–55, fev. 1998.

YAMAGUCHI, S. et al. Conditional knockdown of Nanog induces apoptotic cell death in mouse migrating primordial germ cells. **Development Cambridge England**, v. 136, p. 4011–4020, 2009.

YOUNG, J. M.; MCNEILLY, A. S. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. **Reproduction Cambridge England**, v. 140, p. 489–504, 2010.

ZHANG, M. et al. Gonadotropin-controlled mammal oocyte meiotic resumption. **Front Biosci**, v. 12, p. 282–296, 2007.