

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

DIEGO FERNANDO DUBEIBE MARIN

EFEITO DO SISTEMA L-ARGININA / ÓXIDO NÍTRICO NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS EM PRESENÇA DE HEMISSECÇÕES DE FOLÍCULOS OVARIANOS

Campos dos Goytacazes

Abril / 2013

DIEGO FERNANDO DUBEIBE MARIN

EFEITO DO SISTEMA L-ARGININA / ÓXIDO NÍTRICO NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS EM PRESENÇA DE HEMISSECÇÕES DE FOLÍCULOS OVARIANOS

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal, na área de Concentração de Reprodução e Melhoramento Genético Animal

ORIENTADORA: Prof^a Maria Clara Caldas Bussiere

Campos dos Goytacazes

Abril / 2013

*Às mulheres mais importantes
da minha vida: Dona Uva, Nelly,
Luz Marina, Martha e Magaly.
Com elas, nasce meu compromisso
de fazer sempre as coisas bem.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Maria Clara Caldas Bussiere, por acreditar em mim, por servir de exemplo e contribuir de forma importante na minha formação profissional.

A Carla e a Bruna, pela amizade e pelo grande apoio no desenvolvimento do meu trabalho. A sua eficiência e disposição foram essenciais na execução desse experimento.

Ao professor Angelo José Burla, pela gentileza e por ser essa pessoa sempre solícita, disposta a ajudar e transmitir seus conhecimentos.

À professora Celia Raquel Quirino, pela importante contribuição na análise estatística dos resultados.

A Magaly, pela paciência, pelo carinho, pelo exemplo e por todos os sacrifícios que tem feito para me apoiar na realização dos meus sonhos.

Aos meus pais, de quem recebi as principais ferramentas para construir o caminho que me leva a cumprir meus objetivos de vida.

Aos meus amigos colombianos que aliviaram as saudades do meu país e compartilharam vários momentos de felicidade comigo.

A Maurício Mogollon, pela amizade e por me facilitar o caminho para cumprir um dos meus maiores sonhos profissionais.

A Márcia Faes e a Wlaysia Vasconcelos, pela ajuda na execução do experimento

Aos meus amigos Valter e Bruno, que me acolheram como verdadeiros irmãos e contribuíram enormemente para que eu me sentisse no Brasil como no meu próprio lar.

A cada uma das pessoas do setor de Tecnologia de Embriões que tive o prazer de conhecer, pelo convívio, os risos, as histórias e os momentos que dividiram comigo.

Aos meus companheiros e vizinhos de república, pela feliz convivência e os momentos compartilhados.

À FAPERJ, pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

Neste trabalho, objetivou-se avaliar o envolvimento do sistema L-arginina/óxido nítrico sintase/óxido nítrico (L-arg/NOS/NO) na maturação nuclear durante o cultivo *in vitro* de oócitos bovinos em um sistema com bloqueio da meiose. Grupos de 20 CCOs foram cultivados junto com oito hemisseções (HS) da parede folicular em estufa a 38,5°C e 5% de CO₂, em 200 µL de meio de maturação (TCM 199/BSA), suplementado com diferentes concentrações de L-arginina (2,5; 4; 5; 6; 10 e 50 mM) ou de N^ω-L-nitro-arginine methylester (L-NAME) (0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 e 10 mM). Os controles consistiram de CCOs cultivados em presença ou ausência de HS. Foram avaliados os parâmetros de estágio de maturação nuclear dos oócitos, integridade da membrana plasmática dos oócitos e das células do *cumulus*, concentração de E₂ e P₄ e de nitrato/nitrito no meio de cultivo, e concentração intracelular de AMPc e GMPc dos CCOs. Os resultados foram avaliados por análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste SNK a 5%. As concentrações de 4, 5 e 6 mM de L-arginina aumentaram a proporção de oócitos que atingiram a metáfase II (MII) após 22 horas de cultivo em relação ao controle com HS (24,2±9,0, 27,1±6,4 e 25,9±19,2, vs 8,4±6,5, respectivamente) (P<0,05). Todas as concentrações de L-arginina avaliadas aumentaram a proporção de células do *cumulus* com membrana íntegra quando comparadas aos controles (P<0,05), mas nenhuma delas afetou a concentração de esteroides e de nitrato/nitrito total após 22 horas de cultivo, em relação ao controle com HS (P>0,05). A adição de 10 mM de L-arginina promoveu a retomada da maturação nuclear, mas impediu a progressão da meiose. O cultivo adicional por 16 horas mostrou que este efeito é reversível (6,9± 5,9 vs 66,3±6,2 de oócitos em MII) (P<0,05). A adição de 1 mM de L-NAME aumentou a proporção de oócitos em MII quando comparada ao controle com HS e aos outros tratamentos (P<0,05). A mesma concentração de L-NAME diminuiu a proporção de células do *cumulus* com membrana lesada (P<0,05). Todas as concentrações de L-NAME avaliadas diminuíram a concentração de nitrato/nitrito, mas nenhuma delas afetou a concentração dos esteroides (P>0,05). A adição de L-arginina não afetou a concentração de AMPc nos CCOs, mas atenuou a diminuição na concentração de GMPc (P<0,05). A adição de L-NAME aumentou a concentração de AMPc na primeira hora de cultivo e diminuiu a concentração de GMPc em 3 horas (P<0,05). Estes resultados nos permitem concluir que as alterações na via L-arg/NOS/NO afetam a maturação nuclear e a integridade das células do *cumulus* de CCOs. A L-arginina e L-NAME estimulam a retomada e progressão da meiose por mecanismos diferentes que não envolvem a alteração na concentração de P₄ e E₂. A regulação dos nucleotídeos AMPc e GMPc pode ser a via utilizada pelo L-NAME para estimular a maturação nuclear.

Palavras chave: L-arginina, óxido nítrico, bloqueio meiótico, maturação nuclear, nucleotídeos

ABSTRACT

This work aims to assess the involvement of L-arginine/nitric oxide sintase/nitric oxide (L-arg/NOS/NO) system in the nuclear maturation during *in vitro* culture of bovine oocytes in a system with meiosis arrest. Groups of 20 COCs were cultured together with 8 hemi-sections (HS) of follicular wall at 38,5°C and 5 % of CO₂, in 200 µL of maturation medium (TCM 199/BSA) supplemented with different concentrations of L-arginine (2.5, 4, 5, 6, 10 e 50 mM) or N^ω-L-nitro-arginine methylester (L-NAME) (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, e 10 mM). COCs groups with or without HS were used as controls. The parameters of nuclear maturation state of oocytes, plasma membrane integrity of oocytes and *cumulus* cells, E2 and P4 concentrations and total nitrite in the culture medium, were assessed. Results were assessed using the variance analysis and means were compared using the SNK test. Concentrations of 4, 5 and 6 mM of L-arginine increased the proportion of oocyte in metaphase II (MII) after 22 h of culture in relation to control with HS (24.2±9.0, 27.1±6,4 e 25.9±19.2, vs 8.4±6.5, respectively) (P<0.05). L-arginine increased the proportion of *cumulus* cells with plasmatic membrane intact in all the concentrations tested, when compared to controls (P<0.05), but none of them affected the concentration of steroids and total nitrite after 22 h of culture in relation to the control with HS. High 10 mM of L-arginine promoted the resumption of nuclear maturation, but avoided the meiosis progression. Additional culture for 16 h showed that this effect is reversible (6.9±5.9 vs 66.3±6.2 of oocytes in MII) (P<0.05). 1 mM of L-Name increased the proportion of oocytes in MII when compared to control with HS and the others treatments. The same concentration of L-Name reduced the proportion of *cumulus* cells with injured membrane. All the concentrations of L-NAME assessed reduced the total nitrite levels, but none of them affected the steroids concentration (P>0.05). L-arginine did not affected the AMPc levels in COCs, but attenuated the reduction of GMPc concentrations (P<0.05). L-NAME increased the concentration of AMPc at first hour of culture (P<0.05) and reduced the concentration of GMPc at 3h (P<0.05). These results allow us to conclude that alterations in the L-arg/NOS/NO pathway affect the nuclear maturation and the *cumulus* cells integrity of COCs. L-arginine and L-NAME stimulate the resumption and progression of meiosis by different mechanisms that do not involve alterations in P4 and E2 concentrations. The AMPc and GMPc nucleotides regulation could be the pathway used for L-NAME to induce the nuclear maturation.

Key words: L-arginine, nitric oxide, meiotic arrest, nuclear maturation, nucleotides

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Oócitos corados com orceína 2%. Visualização da configuração dos cromossomos (vermelho), 400x. (A) oócito em estágio de anáfase I; (B) oócito em estágio de metáfase II, a seta indica o corpúsculo polar.....33
- Figura 2. Efeito de diferentes concentrações de L-arginina sobre a integridade de membrana das células do *cumulus*. Valores representam média \pm DP de seis replicatas (n=1800). Letras diferentes (maiúscula ou minúscula) entre as colunas de mesma tonalidade indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).....42
- Figura 3. Efeito de diferentes concentrações de L-arginina na produção de nitrato/nitrito no meio de maturação *in vitro* de CCOs em presença de oito hemissecções (HS) de parede folicular. Controle positivo (C+) = controle sem HS. Valores representam média \pm DP de quatro repetições. Letras diferentes entre as colunas indicam diferenças ($P < 0,05$).....44
- Figura 4. Efeito de diferentes concentrações de L-NAME sobre a integridade de membrana das células do *cumulus*. Valores representam média \pm DP de seis replicatas. Letras diferentes (maiúscula ou minúscula) entre as colunas de mesma tonalidade indicam diferenças ($P < 0,05$).....53
- Figura 5. Efeito de diferentes concentrações de L-NAME na produção de nitrato/nitrito no meio de cultivo (22 horas). Valores representam média \pm DP de quatro replicatas. Letras diferentes entre as colunas indicam diferenças ($P < 0,05$).....55
- Figura 6. Efeitos e vias de ação propostas como consequência das alterações na via L-arg/NOS/NO na retomada da meiose e na preservação da

integridade da membrana plasmática dos CCOs bovinos
cocultivados com HS da parede folicular.....68

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Efeito da adição de L-arginina (L-arg) na maturação nuclear dos oócitos cocultivados com HS de parede folicular, em 22 horas de cultivo.....41
- Tabela 2. Efeito dose-resposta da L-arginina (L-arg) na concentração de progesterona (P_4) e 17β -estradiol (E_2) no meio de maturação de CCOs cocultivados com hemisseções de parede folicular durante 22 horas.....43
- Tabela 3. Efeito de diferentes concentrações de L-arginina (L-arg) sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos cocultivados com oito hemisseções (HS) de parede folicular, em 7 horas de cultivo.....45
- Tabela 4. Efeito de diferentes concentrações de L-arginina (L-arg) sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos cocultivados com oito hemisseções (HS) de parede folicular, em 15 horas de cultivo.....46
- Tabela 5. Efeito de diferentes concentrações de L-arginina (L-arg) sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos cocultivados com oito hemisseções (HS) de parede folicular, em 22 horas de cultivo.....47
- Tabela 6. Efeito de diferentes concentrações de L-arginina (L-arg) na cinética da produção de 17β -estradiol (E_2) de CCOs cocultivados com oito hemisseções (HS) de parede folicular.....48
- Tabela 7. Efeito de diferentes concentrações de L-arginina (L-arg) na cinética da produção de progesterona (P_4) de CCOs cocultivados com oito hemisseções (HS) de parede folicular.....49

Tabela 8. Efeito de diferentes concentrações de L-arginina (L-arg) na cinética da produção de nitrato/nitrito (μM) no meio de cultivo.....	50
Tabela 9. Efeito do cultivo adicional por 16 horas sobre a maturação nuclear de oócitos previamente tratados com 10 mM de L-arginina em cocultivo com HS de parede folicular.....	51
Tabela 10. Efeito da adição de L-NAME na maturação nuclear dos oócitos cocultivados com HS de parede folicular, em 22 horas de cultivo....	52
Tabela 11. Efeito dose-resposta do L-NAME na concentração de progesterona (P_4) e 17β -estradiol (E_2) no meio de maturação de CCOs cocultivados com hemisseções de parede folicular durante 22 horas.....	54
Tabela 12. Efeito da suplementação do meio de maturação com 5 mM de L-arginina ou 1mM de L-NAME sobre a cinética da produção de AMPc ($\mu\text{mol/mL}$) de CCOs cocultivados com HS.....	56
Tabela 13. Efeito da suplementação do meio de maturação com 5 mM de L-arginina ou 1mM de L-NAME na cinética da produção de GMPc ($\mu\text{mol/mL}$) de CCOs cocultivados com HS.....	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Oxido nítrico nos sistemas biológicos	16
3.2	Óxido nítrico na maturação oocitária	18
3.3	Maturação oocitária	20
3.3.1	Maturação nuclear	20
3.3.2	Maturação citoplasmática	21
3.3.3	Maturação molecular	22
3.4	Esteroides na maturação oocitária	24
3.5	Cocultivo de oócitos com células foliculares.....	26
4	MATERIAL E METODOS	30
4.1	Coleta de ovários	30
4.2	Preparação das hemisseções de parede folicular.....	30
4.3	Obtenção dos complexos <i>cumulus</i> -oócitos (CCOs).....	31
4.4	Avaliações	32
4.4.1	Avaliação da maturação nuclear.....	32
4.4.2	Avaliação da integridade de membrana das células do <i>cumulus</i>	33
4.4.3	Mensuração da concentração de esteroides.....	34
4.4.4	Mensuração de nitrato/nitrito como indicador da presença de NO.	34
4.4.5	Mensuração de nucleotídeos AMPc e GMPc	35
4.5	Delineamento experimental.....	36
4.5.1	Grupos experimentais	36
4.5.1.1	Experimento I.....	36
4.5.1.2	Experimento II.....	37
4.5.1.3	Experimento III.....	37
4.5.1.4	Experimento IV.....	38
4.5.1.5	Experimento V.....	38

4.5.1.6	Experimento VI	38
4.6	Análise estatística	39
5	RESULTADOS	40
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÕES	68
8	Referências bibliográficas	69
	ARTIGO SUBMETIDO PARA ABMVZ	80
	ANEXO	94

1. INTRODUÇÃO

O mecanismo exato e as substâncias envolvidas que causam a retomada e a progressão da meiose dos oócitos bovinos *in vivo*, depois do pico de LH, não são completamente entendidos. Os eventos que promovem a maturação nuclear têm sido tecnicamente difíceis de estudar em condições fora de um ambiente fisiológico, uma vez que a estrutura-integridade das células foliculares deve permanecer intacta para preservar a fisiologia normal (MEHLMANN 2005).

A maturação de oócitos em cocultivo com hemissecções (HS) da parede folicular é uma tentativa de simular *in vitro* as condições do ambiente folicular *in vivo*. As células da parede folicular em cultivo, principalmente as células da teca, produzem um fator de natureza desconhecida, solúvel no meio de cultivo, com capacidade de bloquear parcialmente a maturação nuclear dos oócitos (SIRARD e COENEN, 1993). Dessa forma, o cocultivo com HS da parede folicular é um sistema alternativo para estudar as interações que ocorrem entre as células somáticas do folículo e o oócito, e assim entender os mecanismos que levam à completa maturação oocitária e conferem ao oócito a competência de desenvolvimento.

Uma das substâncias que tem sido estudada pelo seu possível envolvimento nos eventos que regulam a maturação oocitária é o óxido nítrico (NO). O NO é uma molécula envolvida em diferentes processos de sinalização inter e intracelular. É produzida a partir da atividade da enzima oxido nítrico sintase (NOS) que catalisa a reação que transforma o aminoácido L-arginina em L-citrulina e NO (NATHAN e XIE, 1994; IGNARRO, 2000).

A NOS pode ser encontrada em três isoformas: a isoforma neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS). As isoformas nNOS e eNOS são constitutivas e dependem do aumento da concentração de cálcio e da calmodulina para exercer a sua atividade, geram NO em baixas concentrações e por curtos períodos de tempo. A iNOS pode ser ativada independentemente da presença de alta concentração de cálcio e/ou calmodulina, e sob um estímulo adequado, produz NO em grande quantidade e por longos períodos (ALDERTON *et al.*, 2001).

A importância do NO nos eventos da maturação oocitária na espécie bovina tem sido demonstrada por trabalhos que detectaram a presença das diferentes isoformas da enzima NOS, principalmente as isoformas eNOS e iNOS, em oócitos e em células somáticas do ovário de bovinos (TESFAYE *et al.*, 2006; PIRES *et al.*, 2009) e por estudos feitos bloqueando a atividade das NOS (MATTA *et al.*, 2009; SCHWARZ *et al.*, 2010) ou alterando as concentrações de NO em meio de maturação (VIANNA *et al.*, 2007 e 2011; SCHWARZ *et al.*, 2008; MATTA *et al.*, 2009).

O NO também tem sido envolvido na regulação da integridade e da viabilidade das células foliculares (TRIPATHI *et al.*, 2009). O efeito do NO nos tecidos pode ser tóxico ou protetor, dependendo da concentração, do tipo de célula e do grau de diferenciação celular (BASINI *et al.*, 1998). A produção endógena de NO, especificamente o NO oriundo da atividade da iNOS, protege as células do *cumulus* da apoptose e preserva a integridade da sua membrana plasmática (MATTA *et al.*, 2009; ZAMBERLAM *et al.*, 2011).

Este trabalho tem o intuito de avaliar o envolvimento do sistema L-arg/NOS/NO durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos em cocultivo com hemisseções da parede folicular e, desta forma, contribuir para o conhecimento dos eventos que levam à aquisição da competência do desenvolvimento oocitário.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Compreender o papel do sistema L-arginina/NOS/NO durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos em presença de hemisseções de parede folicular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Avaliar a influência do sistema L-arg/NOS/NO na maturação nuclear dos oócitos em cocultivo com hemisseções foliculares.
- Avaliar o efeito da adição de L-arginina e do inibidor da enzima óxido nítrico sintase, L-NAME, na integridade de CCOs cocultivados com hemisseções de parede folicular.
- Avaliar a influência do sistema L-arg/NOS/NO na esteroidogênese das células foliculares e a sua relação com o processo de maturação nuclear dos oócitos.
- Determinar a influência do sistema L-arg/NO na síntese de nucleotídeos cíclicos como uma das vias para a aquisição da competência nuclear dos oócitos cocultivados com hemisseções da parede folicular.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Óxido nítrico nos sistemas biológicos

O óxido nítrico (NO) é uma molécula diatômica com várias propriedades biológicas. Possui em sua estrutura química um elétron livre, sendo, dessa forma, uma espécie instável que pode reagir facilmente com outros radicais, e conseqüentemente, tem uma meia-vida biológica bastante curta (3-5 segundos) (IGNARRO, 2000; AGARWAL, 2005(2)).

Essa molécula é solúvel em água e em lipídios, podendo difundir-se facilmente através das membranas biológicas para atuar como um importante agente nos processos de sinalização inter e intracelular (IGNARRO, 2000; FUJII *et al.*, 2005).

As conseqüências da atividade do NO nos sistemas biológicos dependem das reações químicas que este gás sofre. Os efeitos podem ser diretos do NO com o alvo biológico, ou indiretos, quando estes são exercidos por espécies reativas de nitrogênio (ERN) produzidas a partir da reação do NO com outros radicais livres (O_2 e O_2^- principalmente) (AKTAN, 2004).

Os efeitos diretos acontecem principalmente em lugares onde o NO é produzido em baixa concentração e em curto período de tempo, mediando principalmente processos fisiológicos. Ao contrário, os efeitos indiretos ocorrem em lugares expostos à alta concentração de NO por períodos prolongados de tempo, tendo maior relação com a mediação em eventos patofisiológicos (ESPEY *et al.*, 2000; WINK e MITCHELL, 1998; AKTAN, 2004).

A síntese do NO nos sistemas biológicos se dá a partir da atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual apresenta três isoformas. Elas foram denominadas principalmente a partir do lugar onde foram isoladas originalmente (IGNARRO, 2000). Desta forma, as pesquisas feitas no começo da década de 80 para determinar o agente endógeno responsável pela vasodilatação produzida pelas células do endotélio vascular, levaram ao descobrimento da presença da isoforma, desde então, chamada endotelial (eNOS). Os trabalhos que evidenciaram a atividade do NO nos mecanismos de

neurotransmissão excitatória revelaram a existência da isoforma neuronal (nNOS) e os estudos do envolvimento do NO na atividade citotóxica dos macrófagos descreveram a isoforma induzível (iNOS) (AGARWAL *et al.*, 2005; FUJII *et al.*, 2005).

Foi descrita uma isoforma mitocondrial mtNOS. No entanto, existem divergências entre pesquisadores sobre se essa isoforma achada nas mitocôndrias seja realmente uma forma diferente da enzima ou simplesmente as mesmas eNOS e/ou iNOS presentes no ambiente mitocondrial (ZSOMBOR *et al.*, 2005; BROWN, 2001).

A NOS catalisa a conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina, e como subproduto dessa reação é gerado o NO. Para a completa atividade enzimática da NOS, é necessária a presença de oxigênio e de alguns cofatores, como a flavina mononucleótido (FMN), a flavina dinucleótido (FDN) e a nicotinamida-adenina nucleotídeo (NADPH). As isoformas endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), além dos cofatores mencionados, requerem cálcio (Ca^{2+}) e calmodulina em maior concentração para exercer sua atividade, sendo consideradas cálcio/calmodulinas dependentes (ALDERTON *et al.*, 2001).

Além disso, essas duas isoformas apresentam outra diferença significativa que tem a ver com o padrão de atividade. Elas têm uma atividade basal contínua dentro do organismo e, portanto, são responsáveis pela produção constante de baixa concentração de NO, participando em diversos processos fisiológicos, sendo assim chamadas constitutivas. Por outro lado, a isoforma induzível (iNOS), recebe seu nome porque seu padrão de expressão está sujeito à regulação, mostrando importantes incrementos em atividades de citotoxicidade e eventos patológicos (LEWIS *et al.*, 1995).

A produção de NO não depende apenas do mecanismo enzimático que envolve a atividade das NOS. O NO também pode ser produzido por mecanismos não-enzimáticos, a partir de nitrito (NO_2^-) em condições de redução num ambiente com pH ácido. O NO produzido por via não-enzimática pode participar em eventos fisiológicos similares aos que participa o NO produzido enzimaticamente a partir de L-arginina (AKTAN, 2004).

3.2 Óxido nítrico na maturação oocitária

A importância do papel do NO no processo de maturação dos oócitos tem sido descrita por vários autores. A demonstração da presença das isoformas eNOS e iNOS em ovários de diferentes espécies de mamíferos reforça esta teoria. Elas foram achadas nas células da granulosa (GRASELLI *et al.*, 2001; MITCHEL *et al.*, 2004; TAO *et al.*, 2004), nas células do *cumulus* (VAN VOORHIS *et al.*, 1995; JABLONKA-SHARIFF e OLSON, 2000; MITCHEL *et al.*, 2004), e em oócitos de suínos (TAKESUE *et al.*, 2003; HATTORI *et al.*, 2000), ratas (VAN VOORHIS *et al.*, 1995; MITCHEL *et al.*, 2004), camundongos (JABLONKA-SHARIF e OLSON, 1997, 2000) e bovinos (TESFAYE *et al.*, 2006; PIRES *et al.*, 2009), entre outros. A expressão de mRNA para as isoformas da NOS foi registrada em oócitos bovinos (TESFAYE *et al.*, 2006; PIRES *et al.*, 2009) e de búfalo (PAWAN *et al.*, 2012).

Zamberlam *et al.* (2011) demonstraram que a iNOS é expressada nas células da granulosa em bovinos e que seu padrão de expressão é diferente entre folículos dominantes e subordinados. Além disso, mostraram que a expressão de mRNA para iNOS é regulada pelo hormônio folículo estimulante (FSH), fatores de crescimento e estradiol, sugerindo que o NO produzido pela iNOS faz parte do sistema que regula os eventos de dominância folicular, envolvido principalmente no crescimento e sobrevivência das células da granulosa.

O NO tem uma importante relação nos eventos de sinalização celular que envolvem a maturação oocitária. Muitos dos efeitos fisiológicos gerados pela atividade do NO são produzidos via ativação da guanilato ciclase solúvel. Esta enzima catalisa a conversão do guanilato trifosfato (GTP) para o nucleotídeo guanilato monofosfato cíclico (GMPc) e pirofosfato inorgânico (PPi), na presença de magnésio (Mg^{2+}) (BILODEAU-GOESEELS, 2007).

Os nucleotídeos cíclicos têm um importante papel no processo de maturação oocitária *in vivo*. Desde 1978, Dekel e Beers identificaram que uma elevada concentração de AMPc é responsável por manter o bloqueio da maturação nuclear (DEKEL, 2005). O AMPc gerado pelas células somáticas do folículo é transmitido ao oócito via junções comunicantes (*Gap*). Dentro do

oócito, este nucleotídeo se liga à subunidade tipo I da proteína quinase dependente de AMPc (PKA), que, no estado ativo, fosforila proteínas específicas que mantêm o oócito imaturo (BILODEAU *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 2009).

O GMPc produzido pela atividade do NO modula a concentração e a atividade do AMPc por meio da regulação das fosfodiesterases (PDE). Existem nove diferentes tipos de PDEs, das quais duas são reguladas pelo GMPc. A PDE III é a enzima encarregada de degradar o AMPc. Ela é inibida pelo GMPc, resultando em um aumento na concentração de AMPc (IGNARRO, 2000). Desta forma, o NO pode estar envolvido no processo de maturação dos oócitos, via regulação da síntese dos nucleotídeos cíclicos (PANDEY *et al.*, 2010).

A atividade da NOS e a presença do NO são necessárias para a correta maturação meiótica dos oócitos. O bloqueio da atividade da nNOS prejudica a maturação *in vivo* de oócitos de camundongo, os quais não conseguem atingir o estágio de metáfase II, mantendo-se em metáfase I ou desenvolvendo-se anormalmente (JABLONKA-SHARIFF e OISON, 1998).

O uso de inibidores das diferentes formas da NOS, nos meios de cultivo, produz o mesmo efeito na maturação *in vitro* de oócitos de camundongos (SELA-ABRAMOVICH *et al.*, 2008), de bovinos (SCHWARZ *et al.*, 2010; BILODEAU-GOESEELS, 2007; MATTA *et al.*, 2009) e de suínos (CHMELÍKOVÁ *et al.*, 2010; HATTORI *et al.*, 2000; TAO *et al.*, 2004, 2005). Porém, num trabalho realizado por Matta *et al.* (2001), foi descrito que a adição de L-NAME, um inibidor da síntese de NO, não inibe a progressão da meiose em oócitos bovinos. Neste estudo, foi observado que a maturação citoplasmática é mais sensível do que a nuclear, quando as concentrações de NO estão reduzidas no meio de maturação. A diminuição da taxa de blastocistos, quando as concentrações de nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) diminuíram, sugere que o NO pode estar envolvido na regulação da concentração de algumas proteínas relacionadas ao desenvolvimento embrionário inicial.

A relação do NO na maturação oocitária também é descrita na literatura por meio de estudos que utilizaram doadores de NO. Viana *et al.* (2007) demonstraram que os efeitos do nitroprussiato de sódio (SNP) dependem da

concentração utilizada. Uma concentração elevada do doador SNP (10^{-3} M) gera efeitos citotóxicos, principalmente devido à ação deletéria de alta concentração de NO na integridade da membrana plasmática das células do *cumulus* e do oócito, enquanto uma concentração intermediária (10^{-5} M) estimula a maturação nuclear e citoplasmática (VIANA *et al.*, 2011).

3.3 Maturação oocitária

A maturação oocitária é o estágio final da oogênese que começa na vida embrionária e termina na idade reprodutiva com a fertilização do oócito. Este processo se inicia com a formação das células germinativas primordiais que migram até a crista genital e se estabelecem no ovário durante a vida fetal, quando perdem a motilidade e passam a ser chamadas oogônias. Ainda antes do nascimento, estas oogônias sofrem múltiplas divisões mitóticas e então são chamadas oócitos. Neste estágio, as células começam a maturação oocitária com o início da primeira fase da divisão meiótica, mas o processo é interrompido e o núcleo se mantém parado no diplóteno da prófase da primeira meiose, também conhecido como estado de vesícula germinativa (VG) (PINCTON *et al.*, 1998).

Didaticamente, a maturação oocitária pode-se dividir em três processos diferentes (SIRARD, 2000): 1) A maturação nuclear que descreve as modificações dos cromossomos desde o estágio de VG até a metáfase II (MII), 2) A maturação citoplasmática que abrange as mudanças na distribuição e na organização de organelas individuais desde a VG até o estágio de MII e 3) A maturação molecular que é um legado de instruções acumuladas durante o estágio de VG e que controla a progressão nuclear e citoplasmática.

3.3.1 Maturação nuclear

O principal objetivo da maturação nuclear é a produção de um gameta haploide (n), portanto, trata-se de uma divisão reducional dos cromossomos. Consiste de dois ciclos de divisão celular sem nova síntese de DNA. A primeira divisão separa os cromossomos homólogos e a segunda separa as cromátides irmãs. De forma prática, pode-se descrever como a progressão do núcleo oocitário do estágio da prófase I, até a metáfase II da meiose (HOLT e JONES, 2009).

A retomada da meiose é induzida *in vivo* pelo pico de LH, mas também pode ser induzida *in vitro* depois da retirada dos oócitos do ambiente folicular (PINCUS e ENZMANN, 1935).

O primeiro evento depois do reinício da meiose é o rompimento da vesícula germinativa (GVBD). Em seguida, dá-se a formação da placa metafásica no estágio de metáfase I (MI), até completar a primeira fase da divisão meiótica, com a segregação dos cromossomos homólogos entre o oócito e o primeiro corpúsculo polar na telófase I. No final do processo de maturação nuclear, inicia-se a segunda fase da meiose com formação do segundo fuso até atingir a metáfase II, período em que o núcleo é parado de novo, e a segunda meiose só irá completar-se após a fertilização (HOLT e JONES, 2009).

3.3.2 Maturação citoplasmática

A maturação citoplasmática envolve as mudanças morfológicas que dão ao oócito a capacidade de suportar a fertilização e o desenvolvimento embrionário. A aquisição desta capacidade é conhecida como competência oocitária. Mudanças na distribuição citoplasmática e na atividade de importantes organelas, tais como mitocôndrias, retículo endoplasmático (RE) e grânulos corticais (GC), são necessárias para o oócito atingir a total competência (YAMADA e ISAJI, 2011).

As mitocôndrias são as principais organelas responsáveis pela produção de energia em forma de ATP. Tem-se detectado atividade mitocondrial crescente durante o processo de maturação oocitária, sendo baixa em oócitos

imaturos e aumentando gradualmente até finalizar a maturação com uma grande proporção de mitocôndrias ativas (TARAZONA *et al.*, 2006). A distribuição das mitocôndrias durante a maturação também tem sido caracterizada. Oócitos em estágio de VG apresentam uma grande proporção das mitocôndrias na periferia do citoplasma e são observados apenas uns pequenos grupos dispersos mais ao centro da célula. Em oócitos em MII, esta distribuição se torna mais difusa pelo citoplasma inteiro (TARAZONA *et al.*, 2006).

Durante a maturação do oócito, o RE sofre uma reorganização dinâmica, passando de um acúmulo na região central do citoplasma em estágio de VG, para um característico agrupamento na região cortical em oócitos em MII. O RE é um importante reservatório de íons, em especial do cálcio (Ca^{+2}), por isso, estas mudanças, junto com o aumento na quantidade de receptores tipo I para trifosfato de inositol (IP3) na membrana do RE na fase final do processo de maturação, são necessárias para que aconteçam as oscilações de cálcio (Ca^{+2}) que ativam o desenvolvimento embrionário depois da fertilização (YAMADA e ISAJI, 2011).

Os GC são vesículas secretórias formadas a partir do sistema de Golgi que estão presentes no citoplasma dos gametas femininos. Estes são formados nos oócitos em crescimento e sofrem redistribuição no período da maturação (HYTTEL *et al.*, 1997). Inicialmente, os GC podem ser identificados em pequenos grupos no citoplasma dos oócitos em estágio de VG. Sua migração para a periferia do oócito ocorre durante o avanço da maturação, Quando o oócito atinge o estágio de MII, os GC encontram-se distribuídos no córtex, próximos à membrana plasmática (GOTTARDI e MINGOTI, 2009; LIU, 2011).

3.3.3 Maturação molecular

A maturação molecular poderia ser considerada como uma subdivisão da maturação citoplasmática, relacionada à síntese de RNAm específicos e

proteínas, as quais são adicionadas ao estoque oocitário pouco tempo antes que a ovulação aconteça (SIRARD *et al.*, 2006).

Na fase do bloqueio meiótico, a cromatina atinge uma conformação especial, assumindo um estado intermediário entre a condensação e a interfase. Nesse estado especial, os filamentos de cromatina que permanecem descondensados asseguram a transdução dos elementos requeridos e o RNAm produzido pode ser processado ou estocado sob condições especiais antes de ser usado. Estas moléculas de RNA acumuladas durante o período de crescimento oocitário são necessárias para sustentar as fases iniciais do desenvolvimento embrionário. Isto porque o genoma embrionário assume o próprio desenvolvimento só após alguns ciclos celulares (SIRARD, 2000). Esta transição iniciada pela ativação do genoma embrionário é conhecida como transmissão materno-zigótica e, no caso da espécie bovina, ocorre em embriões no estágio de 8-16 células.

Uma parte do RNAm que é produzida durante o período de crescimento oocitário começa a ser traduzida para sintetizar novas proteínas que serão essenciais na progressão do processo de maturação. Algumas proteínas cinases e fosfatases são necessárias para os eventos de fosforilação e desfosforilação, os quais levam ao rompimento da vesícula germinativa (GVBD) (KASTROP *et al.*, 1990; SIRARD *et al.*, 1989). Outras proteínas também são necessárias para a progressão da meiose até o estágio de metáfase II (SIRARD *et al.*, 1989), para a regulação de proteínas estruturais que permitam ao oócito atingir seu diâmetro máximo, para a regulação da penetração espermática e para a descondensação e formação do pró-núcleo masculino depois da fertilização (MOOR *et al.*, 1990).

In vivo, a maturação nuclear e a maturação citoplasmática ocorrem em sincronia. Porém, a maturação citoplasmática pode acontecer mesmo em oócitos com maturação nuclear parada (ALBUZ *et al.*, 2010), o que indica que esses são fenômenos independentes. Na maioria dos mamíferos, os eventos que levam à maturação ocorrem em grandes folículos antrais e são controlados principalmente por fatores presentes no microambiente folicular, incluindo hormônios e fatores de crescimento, e pela comunicação intracelular entre o oócito e as células foliculares (YAMADA e ISAJI, 2011).

3.4 Esteroides na maturação oocitária

Tem sido estabelecido que o pico de gonadotrofinas que induz a maturação oocitária *in vivo* desencadeia uma mudança da produção de esteroides pelas células da granulosa, de um ambiente predominantemente estrogênico para um predomínio progesterônico (HURK e ZHAO, 2005).

Em peixes e anfíbios, os hormônios esteroides produzidos pelas células foliculares, a partir desse estímulo gonadotrófico, agem como um fator positivo para induzir a retomada da meiose (TSAFRIRI *et al.*, 2005). No entanto, em mamíferos, seu papel na regulação da maturação oocitária é discutível (ZHANG, 2009).

Embora a ação dos esteroides na retomada da meiose dos oócitos mamíferos não seja clara, trabalhos recentes indicam que os esteroides ovarianos, principalmente a progesterona (P_4), desempenham um papel importante neste processo (YAMASHITA *et al.*, 2003, JAMNONGJIT *et al.*, 2005). Além disso, a síntese de P_4 pelas células do *cumulus*, durante o cultivo *in vitro*, no período que coincide com o reinício da meiose e a maturação oocitária, sugere um efeito da P_4 neste processo (FAIR e LONERGAN, 2012).

A P_4 exerce seus efeitos por meio da sua interação com receptores específicos. O mais conhecido é um receptor genômico que consiste principalmente de duas isoformas diferentes nPR-A e nPR-B, ambas codificadas pelo mesmo gene. Um mecanismo alternativo, pelo qual a P_4 poderia agir, inclui sua união a receptores não-genômicos mPR α , mPR β e mPR γ . Neste caso, a P_4 medeia seus efeitos não-genômicos por meio dos componentes de membrana do receptor de P_4 PGRMC1 e PGRMC2, os quais pertencem à família de proteínas receptoras de P_4 associadas à membrana (MAPR) (ALKISON, 2012).

Foi demonstrado por Aparicio *et al.* (2011) que os CCOs bovinos expressam receptores genômicos e não-genômicos de P_4 antes e, depois da maturação *in vitro* (MIV) e durante esse processo, a expressão dos receptores muda dinamicamente em resposta à suplementação com FSH, LH e P_4 , indicando um papel ativo desse esteroide no processo de maturação. No

mesmo trabalho, a inibição da síntese de P_4 ou da atividade dos seus receptores não afetou a taxa de maturação, nem a de fertilização dos oócitos, porém reduziu consideravelmente as taxas de produção de blastocistos, sugerindo que a sinalização intracelular mediada pela P_4 não está relacionada com o reinício da meiose, mas poderia ter importância na maturação citoplasmática e o subsequente desenvolvimento embrionário.

Por outra parte, Luciano *et al.* (2010) avaliaram a importância da PGRMC1 na maturação nuclear de oócitos bovinos e determinaram que a inibição da sua atividade, mediante o uso de anticorpos específicos, prejudica a progressão da meiose no núcleo, podendo estar especificamente relacionada ao mecanismo pelo qual os cromossomos são segregados e o primeiro corpúsculo polar é extrusado.

Em cultivo *in vitro* de CCOs suínos, a P_4 foi apontada como um dos fatores produzidos pelas células do *cumulus* essenciais para o reinício da meiose. Além disso, a inibição da síntese do esteroide ativador da meiose (FF-MAS), substância intermediária na via da síntese do colesterol, diminuiu a proporção de oócitos que sofreram rompimento da vesícula germinativa, sugerindo que a fonte da P_4 é a via da síntese de novo do colesterol dentro das próprias células do *cumulus* (YAMASHITA *et al.*, 2003).

Um mecanismo hipotético pelo qual o pico de LH exerce os efeitos que levam a eventos, como a expansão das células do *cumulus*, mudanças na esteroidogênese, maturação oocitária e ovulação, realiza-se por meio da ativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR). Jamnongjit *et al.* (2005) propuseram que o LH age sobre seu receptor, induzindo a liberação do fator de crescimento epidermal (EGF) que, por sua vez, liga-se ao seu receptor nas células foliculares e, dessa forma, incrementa a produção de esteroides, principalmente da P_4 , para provocar o reinício da maturação nuclear.

Estes trabalhos demonstram claramente o envolvimento da P_4 e/ou seus receptores no processo de maturação nuclear e citoplasmática do oócito.

A importância de outros esteroides nos mecanismos, para a retomada da meiose, também tem sido estudada. Gill *et al.* (2004) demonstraram que oócitos de camundongo mantidos em bloqueio meiótico *in vitro*, respondem à testosterona, reiniciando a maturação nuclear de forma dose-dependente.

Também indicaram que o efeito positivo da testosterona foi independente de qualquer atividade transcricional e que talvez fosse mediado através da ativação das vias de sinalização de MAPK e CDK1/cdc2.

Apesar de esses achados evidenciarem o papel essencial dos esteroides na maturação oocitária em mamíferos, alguns autores sugerem que esses dados ainda precisam ser confirmados e argumentam que os resultados divergentes poderiam ser consequência das diferenças nos modelos experimentais utilizados (MOTOLA *et al.*, 2007; TSAFRIRI e MOTOLA 2007).

Motola *et al.* (2007), em um experimento utilizando cultivo de CCOs e de folículos pré-ovulatórios de rato e camundongo, não observaram estimulação da maturação nuclear com progestágenos, estrógenos nem andrógenos. Além disso, o bloqueio dos receptores dos diferentes esteroides não afetou o reinício da meiose desencadeada pelo pico de LH.

Tsafiriri e Motola (2007) afirmaram que, possivelmente, em contraste às espécies de vertebrados inferiores, os esteroides não são substâncias intermediárias obrigatórias para transmitirem os sinais estimulatórios das gonadotrofinas ao oócito através das células foliculares, em espécies evolutivamente mais complexas. Estes autores sugerem que este fato pode estar relacionado à existência de um mecanismo mais elaborado de sinais parácrinos que controlem a maturação nuclear, em um sistema que se caracteriza pela presença de vários folículos em diferentes estádios hierárquicos de crescimento, e a ovulação de só um ou alguns poucos oócitos a cada ciclo estral, conduzindo à exclusão do uso dos esteroides como sinal importante para o reinício da meiose.

3.5 Cocultivo de oócitos com células foliculares

Devido ao fato de os oócitos retomarem a meiose assim que são retirados do folículo, Pincus e Enzmann (1935) hipotetizaram que o folículo inibe de forma ativa o processo de maturação nuclear. Desde então, com o intuito de entender as interações que acontecem entre as células somáticas do folículo e o oócito, e conhecer os mecanismos que levam à retomada da meiose, vários

pesquisadores têm feito estudos *in vitro* mimetizando as condições do ambiente folicular, realizando maturação de oócitos em cocultivo com secções de parede folicular (FOOTE e THIBAUT, 1969; SIRARD E COENEN, 1993; RICHARD e SIRARD, 1996; VAN TOL e BEVERS, 1998, 2001; GIOMETTI *et al.*, 2005; STEFANELLO *et al.*, 2006; BARRETA *et al.*, 2008).

Quando a parede folicular é dissecada e cocultivada *in vitro* com complexos *cumulus* oócitos (CCOs), esta recria o efeito inibitório que tem exerce a maturação nuclear dos oócitos *in vivo* (SIRARD, 2000).

A retomada espontânea da meiose resulta na perda da sincronia da maturação nuclear com a maturação citoplasmática, o que prejudica a aquisição da competência oocitária. O uso de tecidos foliculares em cocultivo com oócitos, no processo de maturação *in vitro*, é um método fisiológico para manter o bloqueio da divisão nuclear e dar um tempo adicional para que o oócito sofra as modificações citoplasmáticas que levam à aquisição da competência de desenvolvimento (LE BEAUX *et al.*, 2003; MACHALKOVA *et al.*, 2004).

Foote e Thibault (1969) publicaram um dos primeiros trabalhos testando o efeito do cocultivo de células foliculares sobre CCOs suínos e bovinos. Neste estudo, foi considerado que o efeito inibitório sobre a maturação nuclear era produzido pelas células da granulosa e que o contato direto destas células com os CCOs era essencial para manter os oócitos em estágio de VG.

No entanto, Richard e Sirard (1996) fizeram dissecção da parede folicular, nos diferentes compartimentos (células da teca interna, da teca externa e da granulosa), e cocultivo dos CCOs com cada tipo de células separadamente. Os resultados revelaram que as células da granulosa podem participar da inibição. No entanto, o principal fator inibitório é gerado nas células da teca. Além disso, concluíram que não seria necessário o contato direto dos CCOs com as células da parede folicular para manter o bloqueio meiótico e que é mais importante a quantidade de tecido folicular usado em relação à quantidade de meio de cultivo utilizado.

No mesmo trabalho, estes autores testaram a atividade inibitória de meio condicionado preparando cultivando duas hemissecções em meio livre de soro por 9 horas. Os CCOs foram transferidos para meio condicionado fresco a cada 4 horas até completar 12 horas de cultivo. Uma alta proporção de oócitos

cultivados em meio condicionado se manteve em estágio de VG, sugerindo que os oócitos respondem a um fator inibitório presente no meio, que tem uma meia-vida curta, visto que o meio precisa ser substituído frequentemente.

A sensibilidade dos oócitos aos inibidores da maturação é modulada durante a foliculogênese, já que a mesma concentração de um modulador ativo usado nos oócitos, em diferentes etapas do desenvolvimento folicular, produziria diferentes respostas (SIRARD *et al.*, 1992). O efeito do fator gerado nas células foliculares não é diferente. Os oócitos respondem heterogeneamente a uma quantidade de fator inibitório presente no meio de cultivo (SIRARD e COENEN, 1993).

Sirard e Coenen (1993) testaram diferentes quantidades de hemisseções (HS) de parede folicular (1, 2 e 5 HS) e observaram um efeito-dose resposta. Além disso, verificaram que, na maioria das vezes, o efeito foi totalmente reversível e não afetou a viabilidade celular nem o posterior desenvolvimento embrionário, exceto quando uma grande quantidade de tecido foi utilizada no cultivo. Nesse caso, os oócitos podem ter sido lesados.

Diferentemente do que acontece *in vivo*, aonde a maturação nuclear é induzida pelo pico de LH, nos estudos realizados mimetizando as condições do ambiente folicular *in vitro*, cocultivando oócitos com metades de parede folicular, a adição de LH no meio de maturação não é suficiente para superar o efeito inibitório gerado pelas células foliculares (RICHARD e SIRARD, 1996).

Van Tol e Bevers (1998) sugeriram que tanto as células da teca, quanto as células da granulosa produzem um fator com capacidade de bloquear a maturação nuclear oócitaria, no entanto, cada tipo celular produz um fator independente com diferente potencial inibitório. Eles afirmaram que as células da teca secretam um fator estável que inibe a progressão da meiose mediada pelo FSH em oócitos unidos a uma porção de células da granulosa, enquanto o fator produzido pelas células da granulosa é menos potente e pode ser superado pelo FSH.

A natureza e o mecanismo dessa inibição não têm sido definidos. Van Tol e Bevers, inicialmente (1998), indicaram que o composto ativo não é nem um esteroide nem uma pequena molécula hidrofóbica. Posteriormente, esses mesmos autores fizeram uma caracterização parcial do fator inibitório e acharam que o fator responsável pelo bloqueio meiótico na espécie bovina é

uma molécula polar, com um peso molecular menor a 5 KD, estável e que não é um peptídeo (VAN TOL e BEVERS, 2001).

Por outro lado, Richard e Sirard (1998) observaram que, quando o soro fetal no meio de cultivo é substituído por albumina, as células foliculares diminuem sua capacidade inibitória, sugerindo que algum componente do soro mantém a produção de uma proteína de 214 KD por parte das células da teca, responsável por manter o bloqueio.

O nível de inibição meiótica dos oócitos cultivados sem FSH é comparável ao nível dos oócitos em meio condicionado de células da teca, podendo este fato apontar que este fator poderia agir inibindo a ligação do FSH ao seu receptor nas células da granulosa (VAN TOL e BEVERS, 2001).

Também existe a hipótese de que múltiplos fatores que agem por diferentes vias podem juntar-se para criar um ambiente que mantenha a inibição da meiose (SIRARD *et al.*, 1992). Dessa forma, a interação de diferentes substâncias produzidas, de forma independente, por cada tipo de célula na parede folicular, poderia agir em conjunto para manter o bloqueio meiótico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de ovários

Ovários de vacas obtidos de abatedouros locais foram colocados em frascos contendo solução salina (0,9% NaCl) e antibiótico (penicilina-estreptomicina, Shotapen LA®, Virbac SA, Carros, França) em temperatura ambiente (~25°C).

Após a lavagem, foram selecionados alguns ovários sem corpo lúteo e com suficientes folículos entre 3 e 8 mm de diâmetro para serem dissecados. Estes foram separados e mantidos na mesma solução fisiológica. Os ovários restantes, destinados para a obtenção dos CCOs, foram mantidos a 30°C. A punção folicular foi realizada somente após o acondicionamento das hemisseções foliculares no meio de maturação.

4.2 Preparação das hemisseções (HS) da parede folicular

Os ovários selecionados para dissecação foram levados à capela de fluxo laminar, e ali permaneceram sobre placa térmica (37°C) em placa de petri (96X6 mm, Corning®, Upton, MA, EUA), com a mesma solução salina e antibióticos, lavados no início. A dissecação dos folículos iniciou com a secção dos ovários ao meio.

Folículos de 3 a 8 mm foram dissecados, selecionados e cortados ao meio com uma lâmina de bisturi. A morfologia do oócito contido no mesmo foi avaliada e as duas HS de parede derivadas de cada folículo foram colocadas em placas de (96X6 mm, Corning®, Upton, MA, EUA), permanecendo sob placa térmica a 37°C até conseguir uma quantidade suficiente de HS foliculares.

Foram escolhidas as paredes dos folículos que apresentaram aparência transparente, com células da granulosa homogêneas e com boa compactação,

e que continham CCOs com mais de três camadas de células do *cumulus* e ooplasma homogêneo.

A lavagem das HS foliculares foi realizada passando-as por quatro poços diferentes, contendo 500 µL de meio de lavagem [meio de cultivo de tecidos (TCM) 199 – HEPES acrescido de 0,4% de albumina isenta de ácidos graxos (FAF), 0,2 mM de piruvato, 100 UI/mL penicilina G potássica, sulfato de estreptomicina 50 µg/mL]. Por último, foram secadas em gaze estéril e transferidas para placas de quatro poços (NUNC[®] Rochester, NY, EUA). Foram colocadas 8 HS em 200 µL (2 HS / 50µL de meio, RICHARD e SIRARD, 1996) de meio de maturação [TCM 199 suplementado com 0,4% de albumina FAF, 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin-V, Bioniche[®], Beleville, Canadá), 5 µg/mL de LH (Lutropin-V, Bioniche[®], Beleville, Canadá) 0,2 mM de piruvato e antibióticos citados acima] pré-aquecidos e pré-gaseificados em estufa de CO₂.

Foram adicionados 3 mL de água ultrapura (PURELAB Máxima, ELGA[®], Bucks, Inglaterra) entre os poços das placas para evitar as perdas de líquido por evaporação e a consequente mudança na osmolaridade do meio durante o período de cultivo (GASPERIN *et al.*, 2010). A seguir, as placas foram transferidas para estufa a 38,5°C, 5% CO₂ e umidade saturada, permanecendo ali por pelo menos 2 horas antes de os CCOs serem adicionados.

4.3 Obtenção dos complexos *cumulus*-oócitos (CCOs)

Os folículos foram aspirados usando seringa de 5 mL e agulha calibre 18 Gx1¹/₂ (40X12), sendo os CCOs imediatamente colocados em meio de lavagem, suplementado com 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX). O IBMX foi adicionado com o objetivo de manter o bloqueio meiótico dos oócitos durante a manipulação (EPPIG e DOWNS, 1984). Somente os CCOs que apresentaram mais de três camadas de células do *cumulus* e ooplasma homogêneo foram selecionados e transferidos às placas (placas de quatro poços, NUNC[®] Rochester, NY, EUA) que já continham as HS das paredes foliculares.

4.4 Avaliações

As seguintes avaliações foram realizadas para os diferentes grupos experimentais e para os controles:

4.4.1 Avaliação da maturação nuclear

Os oócitos foram desnudados por pipetagens repetidas numa solução de PBS com 0,1% de PVA. Posteriormente, foram montados entre lâmina e lamínula, fixados em solução 3:1 de etanol-ácido acético (Merck S. A. Indústrias, Rio de Janeiro, Brasil), durante um período mínimo de 24 horas, e corados com orceína acética 2%. A avaliação do estágio de maturação nuclear de cada oócito foi feita com auxílio de microscópio invertido (NIKON - Eclipse TE300, Melville, USA) (400x). Os oócitos foram classificados dependendo do estágio de maturação nuclear, em: vesícula germinativa (VG), rompimento da vesícula germinativa (RVG), metáfase I (MI), anáfase-telófase (AT) e metáfase II (MII) (Figura 1). Os oócitos que apresentaram condensação elevada da cromatina foram classificados como degenerados (D).

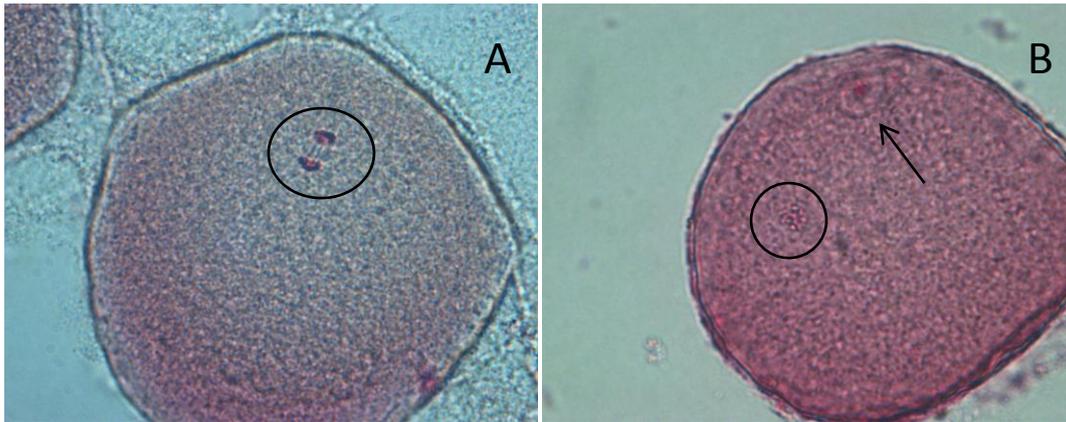


Figura 1. Oócitos bovinos corados com orceína acética 2%. Visualização da configuração dos cromossomos (círculos), 400x. (A) oócito em estágio de anáfase; (B) oócito em estágio de metáfase II, a seta indica o corpúsculo polar.

4.4.2 Avaliação da integridade de membrana plasmática das células do *cumulus*

Para a obtenção das células do *cumulus* e posterior avaliação da integridade da membrana plasmática, após o desnudamento dos oócitos, estes foram retirados e o restante da solução foi centrifugada (2,700 x *g*) por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento (pellet) resultante foi ressuspenso em uma solução com os marcadores fluorescentes: hoechst 33342 (10 µg/mL) e iodeto de propídeo (IP) (10 µg/mL). As células foram colocadas entre lâmina e lamínula, e levadas ao microscópio de epifluorescência (400x, NIKON – Eclipse TE300, Melville, USA) para contagem (200-250 células de cada tratamento). As células foram classificadas em dois grupos: 1) com membrana plasmática íntegra, emitindo fluorescência azul (marcados com Hoechst) e 2) com membrana plasmática lesada, emitindo fluorescência vermelha (marcados com IP).

4.4.3 Mensuração da concentração de esteroides

O meio de cultivo dos diferentes tratamentos foi centrifugado (2700 x g por 5 minutos), o sobrenadante estocado em tubos de microcentrífuga e armazenado em freezer a -20°C para posterior mensuração da concentração de progesterona (P₄) e 17-β estradiol (E₂). Para a mensuração dos esteroides (P₄ e E₂), utilizou-se o sistema automatizado de quimioluminescência (Listed Laboratory Equipment 7 C20 UL[®], MH 15423, série 3975, DPC Immulite I) e o conjunto diagnóstico comercial para medição quantitativa de progesterona ou estradiol (Immulite[®] 1000 Systems, Siemens Healthcare Diagnostics Products Ltd, Glyn Rhonwy, Llbamberis, Gwynedd LL55 4 EL, Reino Unido). O método baseia-se em um imunoenensaio competitivo de fase sólida, com tecnologia de quimioluminescência enzimática com limite de detecção de 15 a 20 ng/mL

Para realizar a mensuração da concentração de P₄, foi feita uma diluição das amostras de 1:20 ou 1:40; e, para E₂, a diluição foi feita de 1:200, ambas em água destilada. Junto com as amostras, foi mensurado um controle alto e baixo. Os resultados das dosagens de P₄ e E₂ foram expressos em nanogramas/mililitro (ng/mL).

4.4.4 Mensuração da concentração de nitrato/nitrito como indicador da presença de NO

A concentração de nitrato/nitrito (NO₃⁻/NO₂⁻) no meio de cultivo foi determinada pelo método baseado na reação colorimétrica de Griess. O reagente de Griess está composto de uma solução de sulfanilamida 2% e *N*-(1-naftil) etilene diamine 0,2% dissolvida em água deionizada. O primeiro reage com o NO₂⁻ presente no meio de cultivo das amostras para formar sal de diazônio que, por sua vez, reage com o segundo reagente para formar um produto de coloração roxa com um pico de absorbância a 540 nm. Para transformar NO₃⁻ a NO₂⁻, as amostras foram incubadas em placas de 96 poços com a solução de redução [10 UI da enzima NO₃⁻ redutase diluída em água

deionizada + 900 μL de água deionizada, 1000 μL do cofator NADPH (5 mg/mL) diluído em água deionizada, 1000 de solução tampão de fosfato de potássio (0.5 M)] a 37°C por 16 horas. A curva padrão de NaNO_3 foi diluída em meio de cultivo de tecidos (TCM) 199, variando de 0.5 a 100 μM . A leitura foi feita em espectrofotômetro (leitor de ELISA, Boitek®, Winooski, EUA) a 540 nm. Foi realizado um gráfico de dispersão com os valores da absorbância. Os resultados foram expressos em $\mu\text{M/L}$.

4.4.5 Mensuração da concentração dos nucleotídeos AMPc e GMPc

A concentração intracelular de AMPc e GMPc foi determinada por meio da técnica de imunoenensaio enzimático (EIA), utilizando-se *kits* comerciais (Cayman's cGMP e cAMP EIA *kits*, Ann Arbor, MI, EUA). Foram utilizados grupos de 10 e 30 CCOs com tamanho similar para a mensuração de AMPc e GMPc, respectivamente. Depois do cultivo, os CCOs foram lavados em meio 199-HEPES suplementado com 0,4% de BSA. Com o objetivo de induzir a lise celular, os CCOs foram transferidos para uma solução de 0,1 M de HCl (200 μL), permanecendo por 20 minutos, sendo agitados em vortex durante 1 minuto a cada 5 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 12,000 x *g* durante 5 minutos e o sobrenadante armazenado a -20°C até serem realizadas as avaliações, de acordo com as instruções dos respectivos *kits*. Todas as amostras foram acetiladas para aumentar a sensibilidade do ensaio, segundo recomendação do fabricante. A concentração dos nucleotídeos foi determinada mediante leitura em espectrofotômetro (leitor de ELISA, Boitek®, Winooski, EUA) a 405 nm. Os resultados das leituras no espectrofotômetro foram transformados para picomol por mililitro (pmol/mL).

4.5 Delineamento experimental

4.5.1 Grupos experimentais:

Os oócitos recuperados foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 20 oócitos/tratamento/repetição. Em cada um dos experimentos, foram avaliados dois grupos-controle diferentes: 1) Controle positivo (C+): Grupo controle de maturação de oócitos sem a presença de hemisseções (HS) de parede folicular (não incluído no experimento V) e 2) Controle negativo (C-): Grupo-controle de maturação de oócitos com presença de HS de parede folicular (8 HS/200 µL de meio).

4.5.1.1 Experimento I: Avaliação do efeito da adição de L-arginina na maturação nuclear e na integridade de membrana de CCOs cocultivados com HS de parede folicular

Inicialmente, foram testadas diferentes concentrações (2,5; 4; 5; 6; 10 e 50 mM) do precursor da síntese de NO, o aminoácido L-arginina, no meio de maturação, em 22 horas de cultivo.

Posteriormente, durante a cinética da maturação (7, 15 e 22 h), foi avaliado o efeito de 2,5; 5 e 10 mM de L-arginina no estágio de maturação nuclear. A integridade da membrana plasmática das células do *cumulus* foi avaliada somente após 22 horas.

Visto que o NO afeta a produção dos esteroides *in vitro* (FAES *et al.*, 2009) e estes podem estar envolvidos na retomada e progressão da meiose (TSAFRIRI *et al.*, 2005; FAIR e LONERGAN, 2012), foi avaliado o efeito da adição de L-arginina na produção de esteroides (P₄ e E₂) pelas células da parede folicular e pelos CCOs no meio de cultivo.

Com o objetivo de avaliar se a adição de L-arginina afeta a produção de NO das células em cultivo, foi avaliada a concentração de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ como indicador indireto da concentração de NO no meio.

Para avaliar o estágio de maturação nuclear e a integridade de membrana, o experimento foi repetido sete vezes. Foram utilizadas amostras de quatro repetições para mensurar a concentração de esteroides e $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ no meio de maturação.

4.5.1.2 Experimento II: Avaliação da reversibilidade do efeito inibitório na progressão da meiose observado com 10 mM de L-arginina

Visto que após a adição de 10 mM de L-arginina os oócitos retomaram a meiose, mas a maior percentagem destes não alcançou a metáfase II, os CCOs pré-tratados com 10 mM de L-arginina, em cocultivo com HS de parede folicular, foram levados a um cultivo adicional por 16 horas em meio de maturação simples (sem L-arginina e sem HS de parede folicular).

Após o cultivo, foi avaliado o estágio de maturação nuclear dos oócitos. O experimento foi repetido seis vezes.

4.5.1.3 Experimento III. Avaliação do efeito da inibição da enzima óxido nítrico sintase (NOS) na maturação nuclear e integridade de membrana plasmática das células do *cumulus*

Foram adicionadas diferentes concentrações do inibidor da NOS, N ω -L-nitro-arginina metilester (L-NAME) (0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 e 10 mM), ao meio de cultivo de CCOs cocultivados com HS de parede folicular, para avaliar o seu efeito na maturação nuclear dos oócitos e na integridade da membrana plasmática das células do *cumulus*, em 22 horas de cultivo. O experimento foi repetido sete vezes.

4.5.1.4 Experimento IV. Avaliação do efeito da inibição da enzima óxido nítrico sintase (NOS) na produção de esteroides (P_4 e E_2)

Visto que o NO afeta a produção dos esteroides *in vitro* (FAES *et al.*, 2009) e estes podem estar envolvidos na retomada e progressão da meiose (TSAFRIRI *et al.*, 2005; FAIR e LONERGAN, 2012), foi avaliado o efeito da adição de L-NAME na produção de esteroides (P_4 e E_2) pelas células da parede folicular e pelos CCOs no meio de cultivo. A mensuração dos esteroides foi realizada no meio de maturação coletado de seis repetições do experimento anterior (experimento IV).

4.5.1.5 Experimento V. Avaliação do efeito da inibição da enzima óxido nítrico sintase (NOS) na produção de NO_3^-/NO_2^-

Com o objetivo de avaliar se a adição de L-NAME diminui a produção de NO das células em cultivo (CCOs/HS), foi avaliada a concentração de NO_3^-/NO_2^- como indicador indireto da concentração de NO no meio. A mensuração de NO_3^-/NO_2^- foi realizada, no meio de maturação coletado de seis repetições do experimento IV.

4.5.1.6 Experimento VI: Avaliação do efeito do sistema L-arg/NOS/NO na concentração de nucleotídeos em CCOs cocultivados com HS de parede folicular

Para avaliar se o sistema L-arg/NOS/NO afeta a concentração dos nucleotídeos (AMPc e GMPc) de CCOs cocultivados com HS de parede folicular, o meio de cultivo foi suplementado com 5 mM de L-arginina (precursor de NO), ou com 1 mM L-NAME (inibidor da NOS). A mensuração foi realizada em CCOs cultivados por 1, 3 e 6 horas.

Junto com os grupos tratados, foi avaliada a concentração dos nucleotídeos no grupo-controle negativo (com HS) e em CCOs imaturos (0 hora de cultivo) sem tratamento. Cada experimento foi repetido quatro vezes.

4.6 Análise estatística

Foram realizadas a análise de consistência dos dados e a estatística descritiva (proc univariate, proc means, SAS 2009). Para as variáveis que apresentaram CV maior que 30%, foi realizada a transformação dos dados (log+1 e arcosin).

O efeito dos diferentes tratamentos sobre as variáveis estudadas foi avaliado pela análise de variância (ANOVA). A comparação entre médias foi realizada pelo teste *SNK* 5% de probabilidade (proc GLM, SAS 2009).

5. RESULTADOS

Experimento I: *Avaliação do efeito da adição de L-arginina na maturação nuclear e na integridade de membrana de CCOs cocultivados com HS de parede folicular*

Inicialmente, foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de L-arginina (2,5, 4, 5, 6, 10 e 50 mM) na maturação nuclear dos oócitos (Tabela 1).

A quantidade de oócitos mantidos em estágio de VG foi significativamente maior ($P < 0,05$) no controle com HS, quando comparada à do controle sem HS e a dos grupos suplementados com L-arginina em concentrações de 4 a 50 mM. Nos estádios de MI e A-T, a proporção de oócitos de todos os grupos tratados com L-arginina e do controle com HS foi maior que a do controle sem HS ($P < 0,05$). Para o estágio de MII, o grupo de oócitos tratados com 4, 5 e 6 mM de L-arginina foi menor que o do controle sem HS ($P < 0,05$), no entanto, mostrou ser maior que o do controle com HS ($P < 0,05$). A adição com 10 e 50 mM não afetou ($P > 0,05$) a quantidade de oócitos que atingiram MII, quando comparada à do controle com HS, e foi menor ($P < 0,05$) quando comparada à do controle sem HS. Somente a adição de 50 mM de L-arginina, no meio de MIV, aumentou a quantidade ($P < 0,05$) de oócitos degenerados.

Tabela 1. Efeito da adição de L-arginina (L-arg) na maturação nuclear dos oócitos cocultivados com HS de parede folicular, em 22 horas de cultivo

Tratamentos	Estádios da maturação nuclear				
	VG	MI	AT	MII	D
C+	0 ^b	12,9±10,1 ^b	7,3± 6,8 ^b	79,7±9,8 ^a	0 ^b
C-	33,9±23,8 ^a	29,9±18,1 ^a	27,6±10,7 ^a	8,4±6,5 ^c	0 ^b
L-arg (mM)					
2,5	20,1±17,4 ^{ab}	37,7±13,9 ^a	29,6±9,3 ^a	12,5±7,1 ^{bc}	0 ^b
4	6,4 ±4,1 ^b	35,3±10 ^a	34,2± 9,8 ^a	24,2±9,0 ^b	0 ^b
5	5,9±7,6 ^b	28,2±11,3 ^a	37,6±14,2 ^a	27,1 ±6,4 ^b	0 ^b
6	10,3±7,5 ^b	31,3±14,1 ^a	32,4±11,4 ^a	25,9±19,2 ^b	0 ^b
10	5,4 ±6,9 ^b	34,4±27,7 ^a	46,4±26,2 ^a	6,9±5,9 ^c	5,8±9,8 ^b
50	0 ^b	39,6±19,7 ^a	38,1±18,8 ^a	1,8±4 ^c	20,5±14,5 ^a

Médias ± DP de sete repetições. Letras diferentes dentro de cada estágio de maturação (mesma coluna) significam que houve diferença ($P < 0,05$). C+: controle sem HS; VG: vesícula germinativa; MI: metáfase I; A-T: anáfase-telófase I; MII: metáfase II; D: alta condensação da cromatina.

Posteriormente, foi determinado o efeito de diferentes concentrações de L-arg (2,5, 4, 5, 6, 10 e 50 mM) sobre na integridade de membrana das células do *cumulus* (CCs) (Figura 2).

A proporção de CCs com membrana íntegra foi maior ($P < 0,05$) nos grupos tratados com 2,5 e 4 mM de L-arg, quando comparada à dos controles com e sem HS, e à concentração elevada de L-arginina (10 e 50 mM). A adição de 10 e 50 mM de L-arg diminuiu (56,7±10,2 e 55,5±11,3, respectivamente) essa proporção de células com membrana íntegra ($P < 0,05$), mas continuou sendo ainda maior que a dos controles ($P < 0,05$).

Proporcionalmente, os grupos tratados com 2,5 e 4 mM de L-arg apresentaram menor porcentagem ($P<0,05$) de CCs lesadas, sendo que essa proporção aumentou ($P<0,05$) nos grupos tratados com concentrações maiores de L-arg (10 e 50 mM) e foi ainda maior nos controles ($P<0,05$).

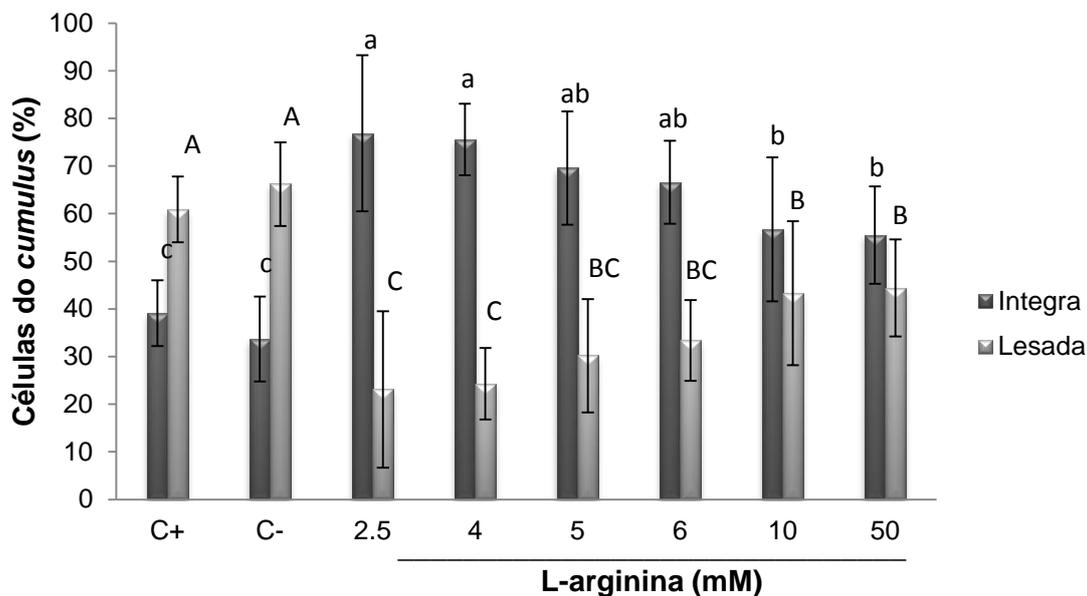


Figura 2. Efeito de diferentes concentrações de L-arginina na integridade de membrana das células do *cumulus*. Valores representam média \pm DP de seis repetições ($n=1800$). Letras diferentes (maiúscula ou minúscula) entre as colunas de mesma tonalidade indicam diferenças significativas ($P<0,05$).

Foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de L-arg (2,5; 4; 5; 6; 10 e 50 mM) na produção de esteroides (P_4 e E_2) (Tabela 2).

A concentração de progesterona no meio de cultivo dos grupos tratados com 2,5 a 10 mM de L-arg, foi semelhante à do controle com HS ($P>0,05$) e significativamente maior ($P<0,05$) que a do controle sem HS. O grupo suplementado com 50 mM de L-arg apresentou uma concentração de progesterona menor ($P<0,05$) que a do controle com HS, no entanto, ainda maior que a do controle sem HS ($P<0,05$).

A concentração de estradiol no meio de cultivo no controle sem HS diferente da observada no controle com HS e demais concentrações observadas nos tratamentos ($P < 0,05$).

Tabela 2. Efeito dose-resposta da L-arginina (L-arg) na concentração de progesterona (P_4) e 17β -estradiol (E_2) no meio de maturação de CCOs cocultivados com hemisseções de parede folicular durante 22 horas

	P_4 (ng/mL)	E_2 (ng/mL)
C+	10,3±3,6 ^c	23,3±4,1 ^b
C-	94,5±36,9 ^a	35,3±1,2 ^a
L-arg (mM)		
2,5	88,5±38,3 ^a	35,6±1,1 ^a
4	65,5±28,2 ^{ab}	37,6±1,2 ^a
5	45,7±27,8 ^{ab}	35,9±2,5 ^a
6	95,2±63,4 ^a	35,4±1,3 ^a
10	52,5±48,6 ^{ab}	35,1±1,1 ^a
50	30±14 ^b	33,9±2,2 ^a

Médias \pm DP de seis repetições. Letras diferentes dentro da mesma coluna significam que houve diferenças ($P < 0,05$). C+= controle sem HS, C-= controle com HS.

Posteriormente foi avaliado o efeito da adição de diferentes concentrações de L-arg (2,5; 4; 5; 6; 10 e 50 mM) na produção de nitrato/nitrito no meio de cultivo (Figura 3).

Todos os grupos suplementados com as diferentes concentrações de L-arg tiveram uma concentração de nitrato/nitrito no meio de cultivo, similar à do controle com HS ($P > 0,05$) e maior ($P < 0,05$) à do controle sem HS.

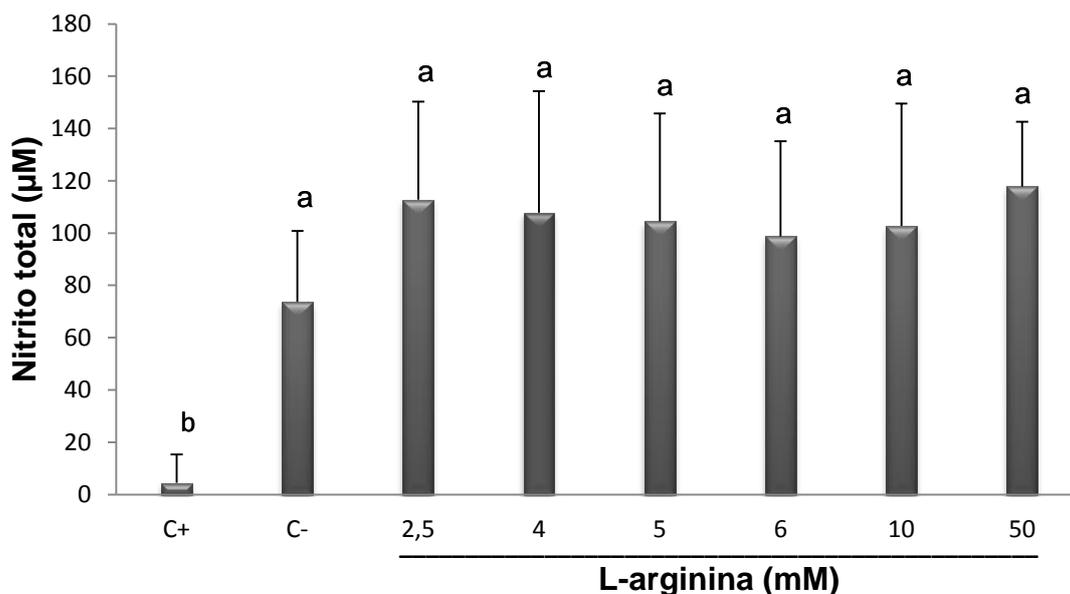


Figura 3. Efeito de diferentes concentrações de L-arginina na produção de nitrato/nitrito total no meio de maturação *in vitro* de CCOs em presença de oito hemisseções (HS) de parede folicular. Controle positivo Controle sem HS = (C+) e controle com HS (C-). Valores representam média \pm DP de quatro repetições. Letras diferentes entre as colunas indicam diferenças ($P < 0,05$).

Foram adicionadas, ao meio de cultivo uma concentração baixa (2,5 mM), uma intermediária (5 mM) e uma alta (10 mM) de L-arg, visando avaliar seu efeito na maturação dos oócitos em 7 horas de cultivo (Tabela 3).

A proporção de oócitos em estágio de vesícula germinativa foi menor ($P < 0,05$) no grupo tratado com 5 mM de L-arg quando comparada à do grupo tratado com 2,5 mM e à do controle com HS, e maior ($P < 0,05$) à do controle sem HS. No estágio de RVG, todos os grupos suplementados com diferentes concentrações de L-arg tiveram uma menor proporção ($P < 0,05$) de oócitos que a do controle sem HS, no entanto, semelhante à do controle com HS; e, no estágio de metáfase I, não houve diferenças entre os tratamentos ($P > 0,05$).

Tabela 3. Efeito de diferentes concentrações de L-arginina (L-arg) na maturação nuclear de oócitos bovinos cocultivados com oito hemisseções (HS) de parede folicular em 7 horas de cultivo

	VG	RVG	MI
C+	18,3±7,3 ^c	73,6±7,9 ^a	7,9±4,1 ^a
C-	75,2±15 ^a	20,9±12,1 ^b	3,9±8,6 ^a
L-arg (mM)			
2,5	78,6±13,1 ^a	19,4±13,5 ^b	1,9±2,9 ^a
5	53,7±13,4 ^b	39,8±17,6 ^b	6,4±8,3 ^a
10	60,8±12,6 ^{ab}	29,5±11 ^b	9,7±14,1 ^a

Médias ± DP de sete repetições, Letras diferentes dentro de cada estágio de maturação (mesma coluna) significam que houve diferenças ($P < 0,05$). C+: controle sem HS; C-: controle com HS, VG: vesícula germinativa; RVG: rompimento da vesícula germinativa; MI: metáfase I.

Foi avaliado o efeito da adição das mesmas concentrações de L-arg (2,5 mM, 5 mM e 10 mM) sobre a maturação nuclear dos oócitos em 15 horas de cultivo (Tabela 4).

Os oócitos tratados com as diferentes concentrações de L-arg avaliadas mostraram-se em menor proporção ($P < 0,05$) no estágio de vesícula germinativa, quando comparados aos do controle com HS, e somente o grupo suplementado com 10 mM apresentou igual proporção de oócitos ($P > 0,05$) que a do controle sem HS neste estágio de maturação. A proporção de oócitos em estágio de metáfase I mostrou ser maior ($P < 0,05$) no grupo tratado com 10 mM de L-arg, no entanto, semelhante a do grupo suplementado com 2,5 mM ($P > 0,05$). Nos estádios de pré-metáfase I e metáfase II, não foram observadas diferenças entre os tratamentos ($P > 0,05$)

Tabela 4. Efeito de diferentes concentrações de L-arginina (L-arg) na maturação nuclear de oócitos bovinos cocultivados com oito hemisseções (HS) de parede folicular, em 15 horas de cultivo

	VG	RVG	MI	A-T	MII
C+	0,9±2,0 ^c	0 ^a	44,1±6,3 ^b	53,5±8,4 ^a	1,4±3,2 ^a
C-	55,2±5,1 ^a	0 ^a	44,8±5,1 ^b	0 ^c	0 ^a
L-arg (mM)					
2,5	31,9±10,6 ^b	3,5±7,9 ^a	56,3±5,9 ^{ab}	8,2±8,9 ^{bc}	0 ^a
5	30,8±21,6 ^b	4,9±7,8 ^a	47,1±7,1 ^b	14,1±7,6 ^{bc}	3,0±7,3 ^a
10	11,5±12,1 ^{bc}	1,2±2,8 ^a	69,1±19,1 ^a	18,2±13,3 ^b	0 ^a

Médias ± DP das porcentagens de sete repetições. Letras diferentes dentro de cada estágio de maturação (mesma coluna) significam que houve diferenças ($P < 0,05$). C+: controle sem HS; C-: controle com HS VG: vesícula germinativa; RVG: rompimento da vesícula germinativa; MI: metáfase I; A-T: anáfase-telófase I; MII: metáfase II.

As mesmas concentrações de L-arg foram adicionadas ao meio de cultivo para avaliar seu efeito na maturação nuclear em 22 h (Tabela 5).

Todos os grupos que foram adicionados com L-arg tiveram uma proporção de oócitos em estágio de vesícula germinativa igual à do controle sem HS e menor que a do controle com HS ($P < 0,05$). Nos estádios de pré-metáfase I e metáfase I, não houve diferenças entre os tratamentos ($P > 0,05$), entretanto, no estágio de anáfase-telófase, o grupo adicionado com 10 mM de L-arg teve uma proporção de oócitos maior que a do controle sem HS ($P < 0,05$). No estágio de MII, o grupo controle sem HS apresentou a maior proporção de oócitos quando comparada com a dos outros tratamentos ($P < 0,05$), e o grupo tratado com 5 mM de L-arg apresentou uma maior proporção de oócitos quando comparada à do controle com HS e a dos outros tratamentos ($P < 0,05$).

Tabela 5. Efeito de diferentes concentrações de L-arginina (L-arg) na maturação nuclear de oócitos bovinos cocultivados com oito hemisseções (HS) de parede folicular, em 22 h de cultivo

	VG	RVG	MI	A-T	MII
C+	0 ^b	0 ^a	10,3±9,4 ^a	9,1±6,3 ^b	79,7±9,8 ^a
C-	33,9±27,6 ^a	0 ^a	22,6±22,2 ^a	30,4±6,3 ^{ab}	8,4±6,5 ^c
L-arg (mM)					
2,5	13,6±12,5 ^b	1,3±2,9 ^a	32,6±13,2 ^a	29,9±15 ^{ab}	12,5±7,1 ^b _c
5	6,4±8,2 ^b	0 ^a	28,8±8,9 ^a	34,7±16,1 ^{ab}	27,1±6,4 ^b
10	3,3±7,5 ^b	0 ^a	33,9±23,3 ^a	50,2±20,5 ^a	6,9±5,9 ^c

Médias ± DP das porcentagens de sete replicatas. Letras diferentes dentro de cada estágio de maturação (mesma coluna) significam que houve diferença ($P < 0,05$). C+: controle sem HS; C-: controle com HS VG: vesícula germinativa; RVG: rompimento da vesícula germinativa; MI: metáfase I; A-T: anáfase-telófase I; MII: metáfase II.

As concentrações baixa (2,5mM), intermediária (5mM) e alta (10mM) de L-arg foram adicionadas para avaliar o efeito na cinética da produção de E₂ (Tabela 6).

As 7 horas de avaliação, o controle com HS apresentou uma maior concentração de estradiol ($P < 0,05$) que as do controle sem HS e dos grupos suplementados com L-arg. Os grupos suplementados com 5 e 10 mM de L-arg tiveram uma concentração de estradiol similar ($P > 0,05$) à do controle sem HS. Não houve diferença entre os grupos que receberam suplementação com L-arg ($P > 0,05$).

Com 15 horas de cultivo não houve diferença na concentração de estradiol entre os tratamentos nem entre os controles ($P > 0,05$). Por sua vez, com 24 horas, os tratamentos não mostraram diferenças entre si e foram

semelhantes ao controle com HS ($P>0,05$), e só o tratamento com 5 mM de L-arg foi maior que a do controle sem HS ($P<0,05$).

Tabela 6. Efeito de diferentes concentrações de L-arginina (L-arg) na cinética da produção de 17β -estradiol (ng/mL) de CCOs cocultivados com oito hemisseções (HS) de parede folicular

	7h	15h	22h
C+	16,4±0,4 ^c	16,8±0,6 ^a	14,8±0,1 ^b
C-	19,9±0,6 ^a	18,5±1 ^a	18,8±0,4 ^a
L-arg (mM)			
2,5	18,4±0,9 ^b	16,7±1,4 ^a	16,9±1,5 ^{ab}
5	17,3±1,3 ^{bc}	18,6±1,9 ^a	18,1±1,5 ^a
10	17,2±0,7 ^{bc}	18,1±3,7 ^a	16,5±0,9 ^{ab}

Médias ± DP de quatro repetições. Letras diferentes dentro da mesma coluna significam que houve diferenças ($P<0,05$). C+ = controle sem HS.

Também foi avaliado o efeito das mesmas concentrações de L-arg na a produção de P_4 (Tabela 7).

Em todas as horas avaliadas, a concentração de progesterona dos grupos suplementados com de L-arg não mostraram diferenças entre eles, foram similares às do controle com HS ($P>0,05$) e maiores do que às do controle sem HS ($P<0,05$).

Tabela 7. Efeito de diferentes concentrações de L-arginina (L-arg) sobre a cinética da produção de progesterona (ng/mL) de CCOs cocultivados com oito hemisseções (HS) de parede folicular.

	7h	15h	22h
C+	5,9±1,5 ^b	9,7±2,3 ^b	10,9±1,6 ^b
C-	85±18,4 ^a	171,3±91,6 ^a	228±8 ^a
L-arg (mM)			
2,5	94,5±26,6 ^a	126±28,2 ^a	222,7±11,4 ^a
5	95,5±26,1 ^a	167,5±91,4 ^a	228,7±62,8 ^a
10	74±16,2 ^a	200±65,5 ^a	170,7±16,3 ^a

Médias ± DP de quatro repetições. Letras diferentes dentro da mesma coluna significam que houve diferenças ($P < 0,05$). C+ = controle sem HS, C- = controle com HS..

Foi avaliado o efeito das concentrações de L-arg sobre a cinética da produção de nitrito total (Tabela 8).

Os grupos suplementados com as diferentes concentrações de L-arg, em todas as horas avaliadas, tiveram uma concentração de nitrito total no meio similar ($P > 0,05$) à do controle com HS e maior ($P < 0,05$) que a do controle sem HS.

Tabela 8. Efeito de diferentes concentrações de L-arginina (L-arg) sobre a cinética da produção de nitrito total (μM) no meio de cultivo

	7h	15h	22h
C+	10,2 \pm 2,2 ^b	14,7 \pm 4,4 ^b	10,7 \pm 1,4 ^b
C-	31,5 \pm 8,7 ^a	62,7 \pm 9,9 ^a	62 \pm 5 ^a
L-arg (mM)			
2,5	36,5 \pm 4,2 ^a	82,1 \pm 22,6 ^a	63,2 \pm 8,1 ^a
5	33,4 \pm 11,9 ^a	63,7 \pm 9,1 ^a	64,4 \pm 24,5 ^a
10	34 \pm 6,2 ^a	68,2 \pm 8 ^a	59 \pm 8,7 ^a

Médias \pm DP de seis repetições. Letras diferentes dentro da mesma coluna significam que houve diferença ($P < 0,05$). C+ = controle sem HS.

Experimento II: *Avaliação da reversibilidade do efeito inibitório na progressão da meiose observado com 10 mM de L-arginina*

O efeito da adição de 10 mM de L-arg sobre a maturação nuclear de oócitos cultivados por 22 horas foi comparado ao efeito de um cultivo adicional por 16 horas, de oócitos previamente tratados com essa concentração de L-arg (Tabela 9).

Não houve diferença significativa nos diferentes tratamentos quanto à proporção de oócitos que permaneceram em estágio de vesícula germinativa e de oócitos degenerados ($p > 0,05$). Entretanto, o tratamento com 10 mM de L-arg durante 22 horas resultou em uma maior proporção de oócitos em estádios intermediários (anáfase e telófase) e menor em estágio de metáfase II, quando comparada à dos grupos com 16 horas adicionais de maturação (controle com e sem HS, e 10 mM de L-arg) ($p < 0,05$).

Tabela 9. Efeito do cultivo adicional por 16 horas sobre a maturação nuclear de oócitos previamente tratados com 10 mM de L-arginina em cocultivo com oito HS de parede folicular.

Tratamentos	Estádio de maturação					
	VG	MI	A-T	MII	D	
10 mM	5,4±6,9 ^a	34,4±27,7 ^a	46,4±26,2 ^a	6,9±5,9 ^c	5,8±9,8 ^a	
Cultivo adicional 16 h	C+	0 ^a	3,1±5,2 ^b	5,4±6,4 ^b	87,7±10 ^a	3,8±9,4 ^a
	C-	1,1±2,4 ^a	10,6±3,8 ^{ab}	5,8±5,4 ^b	82,5±6,7 ^a	0 ^a
	10 mM	0 ^a	18,6±8,9 ^{ab}	9,4±6,2 ^b	66,3±6,2 ^b	5,7±3,2 ^a

Médias ± DP de sete repetições. Letras diferentes dentro de cada estágio de maturação (mesma coluna) significam que houve diferenças ($P < 0,05$). C+: controle sem HS; VG: C-: controle com HS; VG, vesícula germinativa; MI: metáfase I; A-T: anáfase- telófase I; MII: metáfase II; D: alta condensação da cromatina.

Experimento III. *Avaliação do efeito da inibição da enzima óxido nítrico sintase (NOS) na maturação nuclear e integridade de membrana plasmática das células do cumulus*

Inicialmente, foi testado o efeito de diferentes concentrações de L-NAME (0,1, 0,5, 1, 2,5, 5 e 10 mM) sobre a maturação nuclear dos oócitos (Tabela 10).

O grupo tratado com 2,5 mM de L-NAME teve uma proporção de oócitos em estágio de vesícula germinativa menor que a do controle com HS ($P < 0,05$) e semelhante a do controle sem HS. No estágio de metáfase I, no grupo tratado com 1 mM de L-NAME, a proporção de oócitos em estágio de vesícula germinativa foi significativamente menor que a do grupo tratado com 10 mM

($P < 0,05$) e, entre os outros tratamentos, não houve diferenças ($P > 0,05$). A proporção de oócitos que atingiram o estágio de metáfase II, no grupo suplementado com 1 mM de L-NAME, foi maior que a do controle com HS ($P < 0,05$) e similar à do controle sem HS. Nos outros tratamentos, estas proporções foram semelhantes entre si, não apresentaram diferença quando comparadas às do controle com HS ($P > 0,05$) e foram menores que a do controle sem HS ($P < 0,05$).

Nos estádios de rompimento da vesícula germinativa e anáfase-telófase I, não houve diferenças entre os tratamentos ($P > 0,05$).

Tabela 10. Efeito da adição de L-NAME na maturação nuclear dos oócitos cocultivados com HS de parede folicular, em 22 horas de cultivo

	VG	RVG	MI	AT	MII
C+	0±0 ^b	0±0 ^a	5,2±4,1 ^{ab}	5,9±5 ^a	88,9±2,6 ^a
C-	11,9±9,2 ^a	3,1±5,9 ^a	26,0±14,8 ^{ab}	23,9±14,4 ^a	35±10 ^c
L-NAME (mM)					
0,1	6,5±8,1 ^{ab}	4,3±7,6 ^a	12,5±6 ^{ab}	18,7±5,3 ^a	57,9±18,3 ^{bc}
0,5	10,7±7,6 ^{ab}	0±0 ^a	11,5±6,2 ^{ab}	15,2±4,3 ^a	62,4±10,2 ^{bc}
1	5,9±5 ^{ab}	1,5±3,7 ^a	4,9±5,6 ^b	14,6±8,8 ^a	72,9±14,6 ^{ab}
2,5	0,9±2,5 ^b	0±0 ^a	20±17,7 ^{ab}	25,5±24,2 ^a	53,5±21,9 ^{bc}
5	4,1±7,1 ^{ab}	4,1±10,8 ^a	20,4±14,2 ^{ab}	20,8±20,9 ^a	53,5±26,2 ^{bc}
10	4,8±5 ^{ab}	5,2±5,2 ^a	27,1±19,5 ^a	20,8±10,7 ^a	50,9±21 ^{bc}

Médias ± DP, Produto de sete repetições. Letras diferentes dentro de cada estágio de maturação (mesma coluna) significam que houve diferenças ($P < 0,05$). C+: controle sem HS; VG: vesícula germinativa; RVG: rompimento da vesícula germinativa; MI: metáfase I; A-T: anáfase- telófase I; MII: metáfase II.

Foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de L-NAME (0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 e 10 mM) na integridade da membrana plasmática das células do *cumulus* (Figura 4).

Todos os grupos suplementados com L-NAME apresentaram uma proporção de células do *cumulus* com membrana íntegra semelhante à do controle com HS ($P>0,05$) e significativamente maior que a do controle sem HS ($P<0,05$) e não houve diferenças entre as dos controles ($P>0,05$). O grupo tratado com 1 mM de L-NAME teve uma porcentagem de células do *cumulus* com membrana lesada significativamente menor que a dos controles com e sem HS ($P<0,05$). Nos outros grupos suplementados com L-NAME, a proporção de células com membrana lesada foi similar à do controle com HS ($P>0,05$), no entanto, menor à do controle sem HS ($P<0,05$).

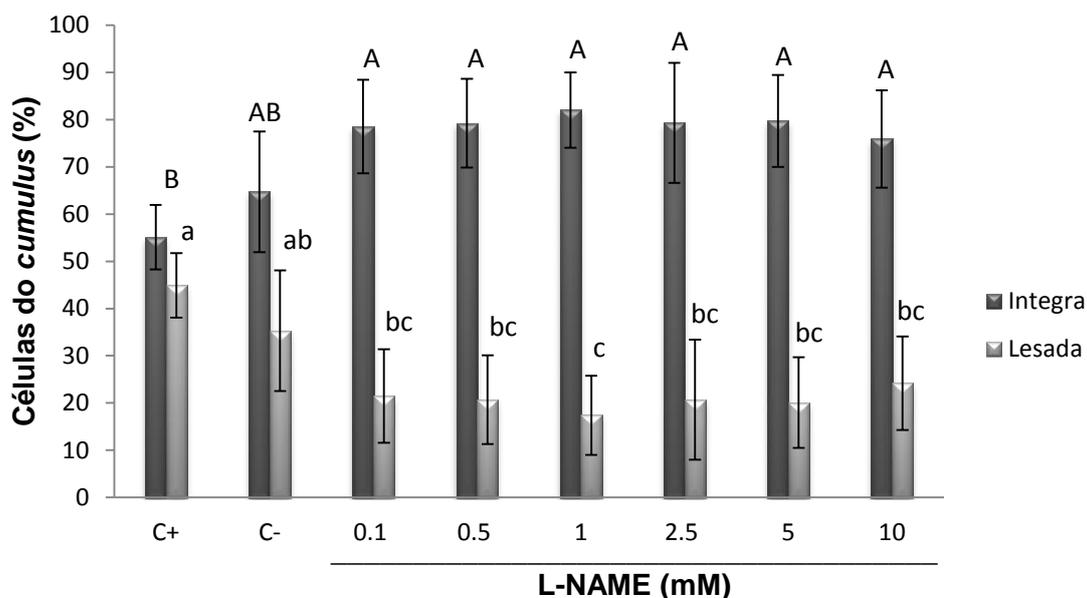


Figura 4. Efeito de diferentes concentrações de L-NAME sobre a integridade de membrana das células do *cumulus*. Valores representam média \pm DP de seis repetições. Letras diferentes (maiúscula ou minúscula) entre as colunas de mesma tonalidade indicam diferenças ($P<0,05$).

Experimento IV. Avaliação do efeito da inibição da enzima óxido nítrico sintase (NOS) na produção de esteroides (P_4 e E_2)

Posteriormente, foi avaliada a adição de diferentes concentrações de L-NAME (0,1, 0,5, 1, 2,5, 5 e 10 mM) na produção dos esteroides (P_4 e E_2) (Tabela 11).

Todos os grupos que receberam suplementação com L-NAME apresentaram uma quantidade de estradiol igual à do controle com HS ($P>0,05$) e maior que a do controle sem HS ($P<0,05$), exceto no tratamento de 5 mM de L-NAME que apresentou concentração semelhante à do controle sem HS ($P>0,05$).

Da mesma forma, todos os grupos suplementados com L-NAME apresentaram uma concentração de progesterona similar à do controle com HS ($P>0,05$) e maior à do controle sem HS ($P<0,05$).

Tabela 11. Efeito dose-resposta do L-NAME na concentração de progesterona (P_4) e 17β -estradiol (E_2) no meio de maturação de CCOs cocultivados com hemisseções de parede folicular durante 22 horas

	P_4 (ng/mL)	E_2 (ng/mL)
C+	12,4±2,8 ^b	38,3±1,3 ^b
C-	352,7±142,7 ^a	54,2±7,8 ^a
L-NAME (mM)		
0,1	535,6±164,4 ^a	49,1±4,5 ^a
0,5	414±237,7 ^a	50,2±11,5 ^a
1	354±149,4 ^a	50,9±2,9 ^a
2,5	410,7±218,3 ^a	51,3±7,7 ^a
5	347,2±110,5 ^a	47,7±6,2 ^{ab}
10	376±208,4 ^a	49,6±8,5 ^a

Médias ± DP de seis repetições. Letras diferentes dentro da mesma coluna significam que houve diferença ($P<0,05$). C+= controle sem HS, C-= controle com HS

Experimento V. Avaliação do efeito da inibição da enzima óxido nítrico sintase (NOS) na produção de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$

Por fim, foi testado o efeito de diferentes concentrações de L-NAME (0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 e 10 mM) sobre a produção de nitrito total (Figura 6).

O grupo-controle com HS apresentou uma concentração de nitrito total, no meio de cultivo, maior ($P < 0,05$) quando comparada com a do controle sem HS e a dos grupos que receberam suplementação com L-NAME. A concentração de nitrito total em todos os grupos suplementados foi semelhante entre eles ($P > 0,05$) e significativamente maior que a do controle sem HS ($P < 0,05$).

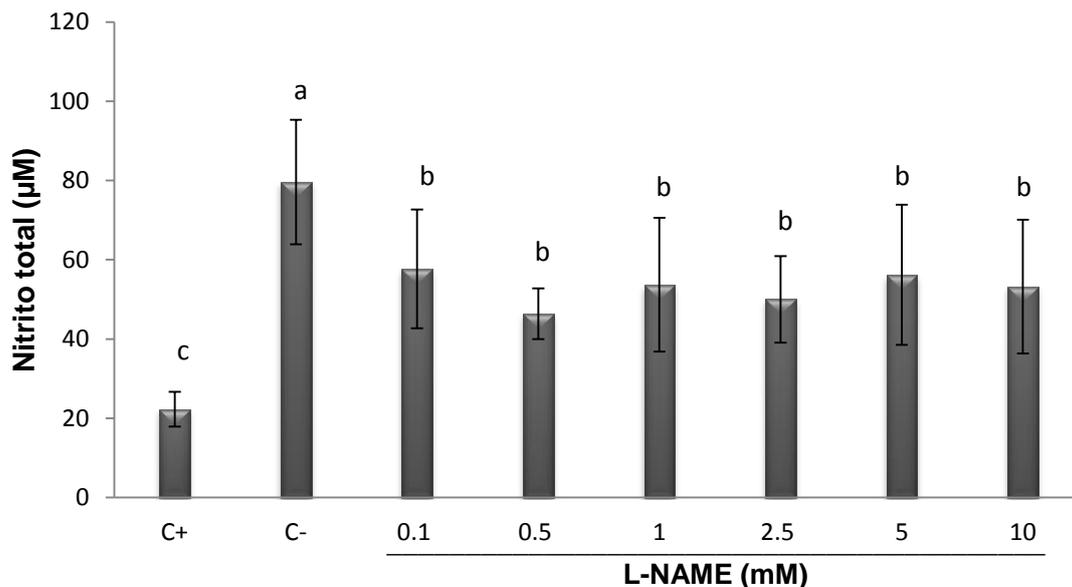


Figura 5. Efeito de diferentes concentrações de L-NAME na produção de nitrito total no meio de cultivo (22 horas). Valores representam média \pm DP de quatro repetições. Letras diferentes entre as colunas indicam diferenças ($P < 0,05$).

Experimento VI: *Experimento VI: Avaliação do efeito do sistema L-arg/NOS/NO na concentração de nucleotídeos em CCOs cocultivados com HS de parede folicular*

Foi testado o efeito da suplementação do meio de maturação com 5 mM de L-arginina ou 1 mM de L-NAME na produção de AMPc de CCOs, em 1, 3 e 6 horas de cultivo (Tabela 12).

Comparada com a concentração de AMPc dos CCOs imaturos (0 horas de cultivo), a concentração de AMPc dos CCOs de todos os tratamentos manteve-se semelhante depois de 1 hora ($P>0,05$), aumentou nas 3 horas ($P<0,05$) e diminuiu novamente nas 6 horas alcançando concentração similar à do grupo-controle com HS e à do grupo tratado com L-NAME ($P>0,05$).

A concentração de AMPc dos CCOs do grupo-controle com HS foi menor com 1 hora de cultivo quando comparada à do grupo tratado com L-NAME ($P<0,05$). Nas 3 e 6 horas, não houve diferenças entre os tratamentos ($P>0,05$).

Tabela 12. Efeito da suplementação do meio de maturação com 5 mM de L-arginina ou 1 mM de L-NAME na cinética da produção de AMPc (pmol/mL) de CCOs cocultivados com HS

Tratamentos	Horas			
	0	1	3	6
C-	0,40±0,26 ^B	0,43±0,15 ^{B b}	1,42±0,58 ^{A a}	0,62±0,42 ^{B a}
L-arginina	0,40±0,26 ^B	0,57±0,11 ^{B ab}	1,30±0,29 ^{A a}	1,10±0,39 ^{A a}
L-NAME	0,40±0,26 ^B	0,92±0,26 ^{AB a}	1,42±0,50 ^{A a}	1,23±0,58 ^{AB a}

Médias ± DP de quatro repetições. Foram avaliados 10 CCOs/tratamento (n=40). Letras maiúsculas na mesma linha ou minúscula na mesma coluna indicam diferenças ($p<0,05$).

O efeito da suplementação do meio de maturação com 5 mM de L-arginina ou 1 mM de L-NAME na produção de GMPc de CCOs, em 1, 3 e 6 horas de cultivo, também foi testado (Tabela 13).

Comparada com a concentração de GMPc dos CCOs imaturos (0 hora de cultivo), a concentração de GMPc dos CCOs de todos os tratamentos diminuiu depois de 1 hora ($P < 0,05$); às 3 horas de cultivo, continuou diminuindo só nos grupos tratados com L-NAME ou L-arginina; e as 6 horas, foi ainda mais baixa no grupo-controle com HS e no grupo adicionado com L-arginina ($P < 0,05$). A concentração de GMPc nos CCOs suplementados com L-NAME aumentou as 6 horas novamente, atingindo concentração similar à observada com 1 hora de cultivo ($P > 0,05$).

A concentração de GMPc com 1 hora de cultivo foi maior no grupo adicionado com L-arginina, quando comparada à dos outros tratamentos ($P < 0,05$); as 3 horas, foi menor no grupo adicionado com L-NAME ($P < 0,05$); e, as 6 horas, foi menor no controle com HS ($P < 0,05$).

Tabela 13. Efeito da suplementação do meio de maturação com 5 mM de L-arginina ou 1 mM de L-NAME na cinética da produção de GMPc (pmol/mL) de CCOs cocultivados com HS

Tratamentos	Horas			
	0	1	3	6
C-	1,23±0,06 ^A	0,33±0,20 ^{B b}	0,53±0,05 ^{B a}	0,03±0,05 ^{C b}
L-arginina	1,23±0,06 ^A	0,87±0,13 ^{B a}	0,55±0,05 ^{C a}	0,12±0,05 ^{D a}
L-NAME	1,23±0,06 ^A	0,25±0,26 ^{B b}	0,07±0,50 ^{C b}	0,17±0,58 ^{BC a}

Médias \pm DP de quatro repetições. Foram avaliados 30 CCOs/tratamento (n=120). Letras maiúsculas na mesma linha ou minúscula na mesma coluna representam diferenças ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi utilizado um sistema de cocultivo de CCOs junto com HS da parede folicular com o intuito de mimetizar as condições fisiológicas, nas quais os oócitos permanecem em bloqueio meiótico, e estudar dentro desse sistema, o possível envolvimento da via L-arg/NOS/NO nos eventos de bloqueio e retomada da maturação nuclear.

As HS da parede folicular bloquearam parcialmente o reinício e a progressão espontânea da meiose. As células foliculares, principalmente as células da teca, produzem algum(ns) fator(es) solúvel(is) no meio, com capacidade para inibir a meiose dos oócitos em cocultivo (RICHARD e SIRARD, 1996). O mecanismo de ação do(s) fator(es) inibitório(s) não é(são) completamente entendido(s). Porém, este poderia incluir efeitos na comunicação intercelular nos CCOs, uma vez que a presença de HS inibiu a expansão e aumentou a integridade das células do *cumulus* (dados não apresentados).

Inicialmente, foi testado o efeito de diferentes concentrações da L-arginina, precursor do NO, na maturação nuclear e na integridade de membrana plasmática das células do *cumulus*.

O NO tem sido identificado como uma das principais moléculas de sinalização inter e intracelular envolvida em diversos processos fisiológicos. O papel do NO nos eventos reprodutivos mostra um padrão bifásico. Em concentração adequada, o NO estimula esses processos, mas a diminuição ou o aumento apresenta efeitos inibitórios.

No presente trabalho, a suplementação com L-arginina mostrou um efeito dose-resposta na maturação nuclear. Concentrações baixas não afetaram a meiose, enquanto concentrações intermediárias estimularam o rompimento da VG e, em certo grau, favoreceram a progressão da meiose, e concentrações elevadas apresentaram efeito inibitório na progressão meiótica.

Bu *et al.* (2003) também observaram um efeito estimulatório de concentrações adequadas do nitroprussiato de sódio (SNP), doador de NO, na maturação nuclear em oócitos de camundongo em um sistema com bloqueio

da meiose. Em concentrações baixas (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M) o SNP reverteu o efeito inibitório da hypoxantina.

Da mesma forma, Bilodeau-Goeseels (2007), usando baixa concentração de SNP (0,01 μ M) em oócitos bovinos, observou um estímulo no reinício da meiose ao encontrar maiores taxas de rompimento da vesícula germinativa com 7 horas de cultivo.

Em outros estudos na espécie bovina, tem sido observado após a adição de concentrações baixas de doadores exógenos de NO, uma melhora na maturação citoplasmática (VIANA *et al.*, 2007 e 2011; SCHWARZ *et al.*, 2008), porém, sem efeito na maturação nuclear. Isto poderia ser explicado porque esses estudos avaliaram o estágio meiótico em um sistema de cultivo com maturação espontânea e somente em 22 horas de cultivo. Deve ser considerada a dificuldade para determinar o efeito benéfico de alguma substância sobre a maturação nuclear em condições de maturação espontânea, quando a avaliação do estágio meiótico é realizada em 22 ou 24 horas de cultivo, uma vez que oócitos que já terminaram a fase de crescimento e são cultivados *in vitro* em um meio adequado, normalmente, atingem uma alta taxa de metáfase II (MII) (SIRARD, 1988).

Foi avaliado o possível envolvimento dos esteroides na via de sinalização do NO, a partir da suplementação com L-arg. Trabalhos recentes indicam que os esteroides podem estar envolvidos na aquisição da competência nuclear dos oócitos de mamíferos (FAIR e LONERGAN, 2012; APARICIO *et al.*, 2011; LUCIANO *et al.*, 2010) e existem evidências de que o NO pode afetar a esteroidogênese das células foliculares *in vitro*, dependendo da sua concentração no cultivo (BASINI *et al.*, 1998; FAES *et al.*, 2009).

No entanto, não houve diferença na produção de esteroides no meio de cultivo após a adição de diferentes concentrações de L-arg. Somente a concentração de 50 mM diminuiu a produção de P_4 em relação à dos demais tratamentos e à do controle com HS. Esta mesma concentração promoveu a retomada da meiose (100%) e promoveu aumento na integridade da membrana plasmática das células do *cumulus* em relação ao controle com HS, porém, aumentou a proporção de oócitos com núcleos condensados (degenerados) e diminuiu a progressão até MII, sugerindo que, nessa concentração, houve um

aumento na proporção de CCOs que sofreram morte celular por apoptose (fragmentação do DNA).

Por outro lado, a avaliação do efeito dos tratamentos na cinética de maturação, mostrou que às 7 horas houve uma diminuição na produção de E_2 , contudo, essa diminuição foi discreta e não foi acompanhada por variações na concentração de P_4 (FAIR e LONERGAN, 2012). Nessa condição, não é possível inferir que seja o mecanismo de retomada da meiose.

Esses resultados sugerem que o mecanismo de retomada da meiose utilizado pela L-arg, nas condições avaliadas neste estudo, não compromete a regulação na proporção dos esteroides (E_2/P_4) no sistema de cultivo.

Embora não tenha havido diferença entre as concentrações de nitrato/nitrito no meio de cultivo em que foram adicionadas as diferentes concentrações de L-arginina avaliadas em relação às do controle com HS, este fato indicou que não houve alteração nas concentrações de NO e que existe a possibilidade de que, em determinadas concentrações desse aminoácido, haja diferenças nos padrões de atividade das distintas isoformas da NOS.

Um padrão de atividade diferenciado, favorecendo a ação de alguma das isoformas em particular, poderia fazer parte dos mecanismos que regulam os eventos de retomada e progressão da meiose (MICHEL e FERON, 1997). O efeito de diferentes concentrações de L-arginina sobre a atividade das isoformas da NOS não foi objeto de estudo no presente trabalho.

Por outro lado, o aumento observado na maturação nuclear devido à suplementação com L-arginina, também poderia ser explicado pela atividade direta desse aminoácido sobre a mesma.

Os aminoácidos não só funcionam como estruturas para a síntese de proteínas e energia para as células e tecidos, mas também, em determinadas situações, podem atuar como moléculas de sinalização celular (KIM, 2011).

Existe evidência de que a arginina ativa a via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK/ERK), como mecanismo essencial na resposta imunológica dos macrófagos (YAN e LAMB, 2011). A atividade aumentada da MAPK nas células somáticas do folículo, induz a maturação nuclear. A MAPK ativa outras substâncias e fosforila proteínas (conexina 43) das junções intercomunicantes. Este bloqueio da comunicação intercelular interrompe a entrada dos sinais inibitórios ao oócito (SUN *et al.*, 2009), assim,

nessas condições, a L-arginina poderia agir como um aminoácido modulador das vias de sinalização que levam à retomada da meiose.

Alta concentração de L-arginina mostrou ser inibitória, diminuindo a proporção de oócitos em MII. Mediante avaliação da cinética da maturação nuclear, foi observado que alta concentração de L-arginina não afetou o rompimento da vesícula germinativa, mas impediu a progressão da meiose.

Estudos em bovinos também têm evidenciado que altas concentrações de NO provenientes de fonte exógena tem efeito inibitório na maturação nuclear. SCHWARZ (2011) descreveu que altas concentrações de SNAP afetam a retomada da meiose. Viana *et al.* (2007) observaram retardo no rompimento da vesícula com 8 horas de cultivo e inibição na progressão com alta concentração (10^{-3} M) de SNP. De igual maneira, Bilodeau-Goeseels (2007), utilizando concentrações elevadas de SNP, evidenciou um retardo na retomada da meiose.

Diferentemente desses estudos, no presente trabalho, alta concentração de L-arginina (10 e 50 mM) mostraram afetar a progressão da meiose, mas não apresentaram inibitório na retomada da maturação nuclear. Pelo contrário, ainda que não houvesse um efeito significativo nessas concentrações, foi observada uma antecipação do rompimento da vesícula germinativa.

Essas diferenças podem ser em decorrência das variações nas condições experimentais. A natureza de doador utilizado, a concentração mais elevada estudada ou o próprio sistema no qual foi avaliado poderiam ter influenciado os resultados.

O mecanismo de bloqueio exercido pela alta concentração de L-arg (10 mM) não foi estudado, no entanto, foi descartado que fosse devido a um efeito tóxico sobre os CCOs. O cultivo adicional por 16 horas, em meio sem HS foliculares e sem suplementação com L-arg, foi suficiente para permitir que os oócitos atingissem o estágio de MII.

Altas concentrações de outros doadores inorgânicos têm mostrado ser irreversíveis e apresentar efeitos tóxicos sobre os CCOs bovinos. Viana *et al.* (2007) não observaram avanços na progressão da meiose com o cultivo adicional por 24 horas de oócitos previamente expostos a alta concentração de SNP (10^{-3} M). Bilodeau-Goeseels (2007) indicou que altas concentrações de SNAP poderiam ocasionar falhas na formação do fuso meiótico.

A presença de HS de parede folicular no cultivo dos CCOs avaliados neste estudo pode ter favorecido a viabilidade dos oócitos, visto que independentemente da concentração do doador utilizado, a concentração de nitrato/nitrito manteve-se estável. Mecanismos antioxidantes das células em cultivo teriam a capacidade de neutralizar a produção exponencial de NO a partir da L-arg, evitando o surgimento de concentrações tóxicas de NO em meio de cultivo.

Todas as concentrações de L-arg estudadas melhoraram a integridade das células do *cumulus* em relação às dos controles. Este efeito pode ter sido mediado via L-arg/NO. Outros trabalhos têm demonstrado o efeito protetor do NO sobre a integridade celular na espécie bovina. Zamberlam *et al.* (2011) evidenciaram a participação do NO na inibição da expressão de genes responsáveis por desencadear a cascata apoptótica e, dessa forma, destacou-se seu envolvimento na proteção das células contra a atresia. Matta *et al.* (2009) observaram que a inibição da atividade da iNOS reduz a viabilidade das células do *cumulus*, indicando que determinada concentração de NO, oriunda da atividade da iNOS, é necessária para preservar a integridade celular.

Por outro lado, a arginina também é o substrato para a síntese de poliaminas, via ornitina descarboxilase (ODC1) (KIM, 2011). As poliamidas (putrescina, espermidina e espermina) são substâncias essenciais envolvidas na regulação da expressão gênica, estabilização de membranas e síntese de proteínas e DNA, portanto, são elementos necessários para a proliferação e diferenciação celular (WU *et al.*, 1998; KUSANO *et al.*, 2008). Existe a possibilidade de que o efeito benéfico observado pela suplementação do meio de cultivo com L-arg seja também consequência da atividade das poliaminas, favorecendo a proliferação e a sobrevivência das células do *cumulus*.

Foram avaliadas as consequências da inibição da atividade das NOS sobre a maturação nuclear, a integridade de membrana das células do *cumulus* e a produção de esteroides.

O L-NAME nas concentrações utilizadas mostrou ser efetivo na diminuição da produção de NO, visto que as concentrações de nitrito total diminuíram no meio de cultivo dos CCOs tratados, quando comparados às do controle com HS. No entanto, independentemente da concentração utilizada,

as concentrações de nitrito total continuaram sendo maiores em todos os grupos tratados em relação às do controle sem HS.

L-NAME é um inibidor competitivo das NOS. De forma seletiva, inibe a produção de NO proveniente da eNOS e iNOS, porém, apresenta maior efeito inibitório da eNOS (MONCADA *et al.*, 1991). Dessa forma, a completa inibição de todas as isoformas responsáveis pela produção de NO pode não ter ocorrido, permitindo que a síntese de NO pelas outras isoformas presentes nas células somáticas das paredes foliculares e do próprio oócito (PIRES *et al.*, 2009) contribuísse para manter ainda concentrações moderadas de NO. Além disso, como o L-NAME age de forma competitiva com a L-arg pelos sítios de ligação nas NOS, as concentrações utilizadas podem não ter sido suficientes para impedir totalmente que a L-arg se ligasse a esses sítios e fosse metabolizada para NO.

A suplementação do meio de cultivo com 2,5 mM de L-NAME mostrou efeito benéfico na retomada da meiose, enquanto que 1 mM promoveu a progressão do ciclo celular até o estágio de MII.

Tem sido verificado que a diminuição nas concentrações de NO, em folículos pré-ovulatórios em ratas, é um pré-requisito fundamental para a retomada da maturação nuclear (NAKAMURA *et al.*, 2002; SELA-ABRAMOVICH *et al.*, 2008; TRIPATHI *et al.*, 2009).

Contudo, uma forte diminuição na produção de NO também se tem mostrado prejudicial para a maturação nuclear. Na espécie bovina, Schwarz *et al.* (2010) mostraram que alta concentração de L-NAME no meio de cultivo diminuem as taxas de MII em oócitos em condições de maturação espontânea. Matta *et al.* (2009) observaram que altas concentrações de aminoguanidina (AG), inibidor específico da iNOS, prejudica a progressão da meiose; e Bilodeau-Goeseels (2007), utilizando o mesmo inibidor, observou um bloqueio no rompimento da vesícula germinativa.

Portanto, a diminuição das concentrações de NO para concentrações fisiológicas, dentro do meio de cultivo, produto de um balanceamento entre a atividade de determinadas concentrações do inibidor L-NAME e a produção de NO por parte das células em cultivo, poderia explicar os efeitos benéficos observados na maturação nuclear.

Por outro lado, foi observado que independentemente da concentração de L-NAME utilizada, as concentrações de nitrato/nitrito, em todos os grupos tratados, diminuíram a uma concentração semelhante.

A atividade das diferentes isoformas da NOS apresenta um padrão variável ao longo do desenvolvimento folicular (TESFAYE *et al.*, 2006). Mudanças na expressão gênica e na atividade de isoformas específicas da NOS seriam necessárias para dar lugar aos eventos que regulam a maturação nuclear em mamíferos (TAO, 2005), desta maneira, em determinado nível de atividade, o L-NAME poderia ter regulado a atividade das NOS, levando a atividade de alguma(s) isoforma(s) específica(s) a concentrações adequadas que favorecessem a maturação nuclear.

A adição de L-NAME ao meio de cultivo não afetou a integridade de membrana das células do *cumulus*. A proporção de células com membrana íntegra foi semelhante à do controle com HS. No entanto, a concentração de 1 mM de L-NAME diminuiu significativamente a porcentagem de células com membrana lesada.

De forma contrastante, o uso de inibidores da NOS em condições de cultivo diferentes (sem a presença de HS) tem mostrado efeitos prejudiciais na integridade da membrana plasmática das CCs (MATTA *et al.*, 2009).

O NO pode ser um agente tóxico ou protetor dependendo da concentração, do tipo de célula e do grau de diferenciação celular (BASINI *et al.*, 1998). Em determinadas concentrações, o NO tem a capacidade de proteger as membranas celulares dos danos gerados pela peroxidação lipídica, induzida por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, pela sua afinidade de ligação aos radicais livres que as induzem (O_2^- e ONOO) (RUBBO *et al.*, 2006).

Como mencionado anteriormente, a presença de grande quantidade de células foliculares no cultivo poderia ter adicionado substâncias antioxidantes que contribuíram para a proteção das membranas plasmáticas, entre essas, o próprio NO. Adicionalmente, a ação inibitória de determinada concentração de L-NAME sobre a NOS podem ter contribuído para a manutenção de NO em níveis que favoreceram ainda mais a integridade celular.

Embora tenha sido demonstrada a importância do NO como um modulador da esteroidogênese nas células foliculares na espécie bovina

(BASINI *et al.*, 1998; FAES *et al.*, 2009), no presente estudo, não foi observado uma alteração na produção de esteroides (P_4 e E_2) em nenhuma das concentrações de L-NAME avaliadas.

As condições experimentais nas quais foi desenvolvido o estudo poderiam explicar essa observação. Uma elevada quantidade de células com capacidade esteroidogênica no cultivo (HS foliculares) poderia não ter sido afetada por nenhuma das concentrações de inibidor utilizadas neste experimento. Provavelmente, a utilização de concentrações ainda maiores tivesse sido necessária para observar esses efeitos.

Uma vez observado o efeito positivo na maturação nuclear dos oócitos, pela adição de determinadas concentrações de L-arginina ou L-NAME, foi avaliado se essas substâncias afetam a concentração intracelular dos nucleotídeos, AMPc e GMPc no CCO, como via para estimular a retomada e a progressão da meiose.

A concentração de AMPc nos CCOs de todos os grupos avaliados apresentou um aumento gradativo desde a primeira hora de cultivo, atingindo um pico em 3 horas. A presença de gonadotrofinas, principalmente de FSH, no meio de maturação utilizado, poderia ter induzido esse resultado. Luciano *et al.* (2004) observaram que a suplementação do meio de maturação com gonadotrofinas e/ou soro fetal pode afetar as concentrações intracelulares de AMPc durante as primeiras horas de cultivo. O FSH ativa receptores de membrana e proteínas G das células-alvo, os quais induzem a produção de AMPc via ativação da enzima adenilato ciclase (AC) (MEHLMANN, 2005; LUCIANO *et al.*, 2005).

Alta concentração de AMPc intraocitária tem sido relacionada com o bloqueio da meiose (DEKEL *et al.*, 1988). De fato, a adição de substâncias que estimulam a produção de AMPc em sistemas de maturação *in vitro* impede a retomada da meiose (BILODEAU *et al.*, 1993). No entanto, a alteração na concentração de AMPc não parece ser o mecanismo pelo qual as HS da parede folicular exercem o efeito inibitório na maturação nuclear, visto que, quando comparada com a do grupo de CCOs tratado com a concentração de L-NAME que estimulou a meiose, o controle com HS apresentou a concentração mais baixa de AMPc durante a primeira hora de cultivo e não foi diferente a dos outros tratamentos nas horas subsequentes da avaliação.

A adição da concentração estimulatória de L-arginina não afetou a concentração de AMPc intracelular nos CCOs nas condições de cultivo estudadas. A variação na concentração de AMPc nos CCOs tratados foi similar a do grupo-controle ao longo das horas avaliadas.

No entanto, a adição de L-arginina no meio de maturação atenuou a diminuição na concentração de GMPc dos CCOs. Mesmo que a concentração desse nucleotídeo tivesse mostrado a mesma diminuição observada nos outros tratamentos, desde o início do cultivo em comparação à hora 0, esta foi maior durante a primeira hora e, posteriormente, em 3 horas de cultivo, quando comparada com a do controle. A via mais usual de atividade do NO é por meio do GMPc via ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs). Assim, em presença do precursor do NO, a via L-arg/NO/GCs/GMPc manteve-se ativa, garantindo concentrações maiores de GMPc dentro dos CCOs.

As mudanças nas concentrações de AMPc e GMPc nos CCOs tratados com a dose de L-arginina avaliada, não mostraram relação com os resultados observados na maturação nuclear, sugerindo que a L-arginina estimula o reinício da meiose por vias diferentes que não incluem a alteração na concentração desses nucleotídeos.

A adição de 1 mM de L-NAME ao meio de maturação manteve uma maior concentração de AMPc durante a primeira hora de cultivo, quando comparada à do controle com HS. Bu *et al.* (2004) sugerem que o efeito estimulatório sobre a maturação nuclear induzido pelo NO, em determinadas concentrações, está baseado na via de sinalização do AMPc. O aumento transitório nas concentrações de AMPc nas células do *cumulus* tem sido apontado como um dos mecanismos responsáveis por induzir a maturação nuclear *in vitro* via ativação da MAPK (SUN *et al.*, 2009).

Por outro lado, a concentração de GMPc nos CCOs tratados com L-NAME na mesma concentração estimulatória da maturação nuclear apresentou uma queda acentuada as 3 horas de cultivo. Schwartz (2011) afirmou que, durante o processo de maturação oocitária em bovinos, deve existir uma queda nas concentrações de NO, com a conseqüente redução da atividade da GCs e, portanto, da concentração de GMPc para que a retomada da meiose possa acontecer. Da mesma forma, tem sido proposto que uma diminuição na atividade da via NO/GCs/GMPc, principalmente, nas células do *cumulus*, possa

dar lugar à retomada da meiose em oócitos de roedores (SELA-IBRAMOVICH, 2008).

Assim sendo, os resultados observados neste estudo indicam que a diminuição da atividade da NOS (principalmente eNOS), atingida pela concentração de L-NAME utilizada, possivelmente levou à ativação de uma via de sinalização que alterou a concentração intracelular dos nucleotídeos AMPc e GMPc nos CCOs cultivados em um sistema com bloqueio da meiose.

7. CONCLUSÕES

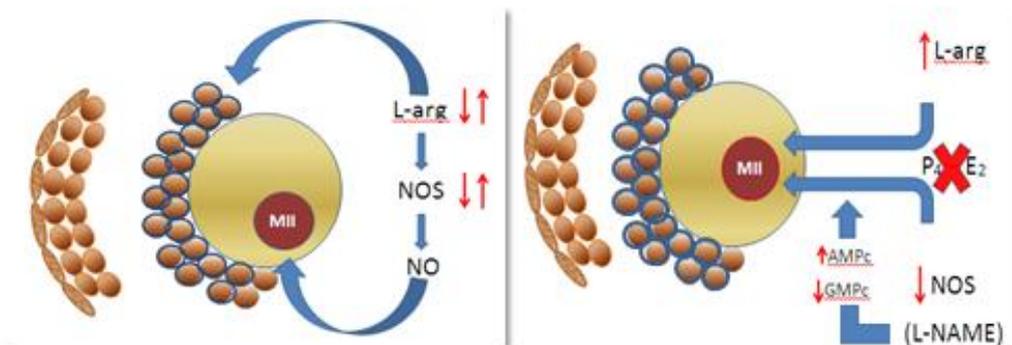


Figura 6. Efeitos e vias de ação propostas como consequência das alterações na via L-arg/NOS/NO na retomada da meiose e na preservação da integridade da membrana plasmática dos CCOs bovinos cocultivados com HS da parede folicular.

- As alterações na via L-arg/NOS/NO afetam a maturação nuclear e a integridade das células do *cumulus* de CCOs bovinos cultivados em um sistema de cultivo em presença de hemisseções de parede folicular.
- Os mecanismos que levam à retomada e progressão da meiose depois da adição de L-arginina ou da inibição da NOS, quando avaliados em um sistema de cocultivo com HS de parede folicular, não envolvem a alteração na concentração de E₂ e P₄.
- Os resultados sugerem que a L-arginina estimula a retomada da maturação nuclear de oócitos em bloqueio meiótico por vias diferentes à regulação dos nucleotídeos AMPc e GMPc.
- A diminuição da atividade da NOS em CCOs cocultivados com HS de parede folicular regula a concentração intracelular de AMPc e GMPc durante as primeiras horas da maturação. Esses eventos podem estar relacionados com a aquisição da capacidade dos oócitos para retomarem a meiose e alcançarem a MII em um sistema inibitório.

6. Referências bibliográficas

Adams, G.P; Jaiswal, R; Singh J. et al. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, v.69, p.72-80, 2008.

Aerts, J.M.J; Bols, P.E.J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species, Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reproduction of Domestic Animals*, v.45, p.171-179, 2010.

Agarwal, A; Gupta, S; Sharma, R. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproduction Biology and Endocrinology*, v.14, p.28, 2005.

Agarwal, A; Gupta, S; Sharma, R. Oxidative stress and its implications in female infertility- A clinician's perspective. *Reproduction Biomedicine Online*, v.11, p.641–650, 2005. (2)

Akison, L.K; Robker R.L. The critical roles of progesterone receptor (PGR) in ovulation, oocyte developmental competence and oviductal transport in mammalian reproduction. *Reproduction Domestic Animals*, v.47 (Suppl. 4), p. 288–296, 2012.

Aktan, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences*, v.75, p.639–653, 2004.

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

Alderton, W.K; Cooper, C.E; Knowles, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, v.357, p.93-615, 2001.

Aparicio, I.M; Garcia-Herreros, M; O'Shea, L.C. et al. Expression, regulation, and function of progesterone receptors in bovine *cumulus* oocyte complexes during in vitro maturation. *Biology of Reproduction*, v.84, p.910–921, 2011.

Armstrong, D.G; Gutierrez, C.G; Baxter, G. et al. Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology*, v.165, p.101–113, 2000.

Barreta, M.H; Oliveira, J.F.C; Ferreira, R. et al. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E₂ and F_{2α}. *Reproduction*, v.136. p.733-740, 2008.

Basini, G; Baratta, M; Ponderato, N. et al. Is nitric oxide an autocrine modulator of bovine granulosa cell function? *Reproduction Fertility and Development*, v.10, p.471–478, 1998.

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

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

Braw-Tal, R. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.87, p.11–18, 2002.

Brown, G.C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochimica ET Biophysica Acta*, v.1504, 46–57, 2001.

Bu, S; Xia, G; Tao, Y. et al. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes *in vitro*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.207, p.21-30, 2003.

Bu, S; Xie, H; Tao, Y. 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. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.223, p.85–93, 2004.

Chmelíková, E; Jeřseta, M; Sedmíková, M. et al. Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. Cambridge University Press, v.18, p.235-244, 2010.

Coccia, M.E; Rizzello, F. Ovarian reserve. *Annals of the New York Academy of Science*, v.1127, p.27–30, 2008.

Dekel, N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.234, p.19-25, 2005.

Dekel, N; Galiani, D; Sherizly, I. Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.56, p.115–21, 1988.

Eppig, J,J; Downs, S.M. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biology of Reproduction*, v.30, p.1–11,1984.

Espey, M.G; Miranda, K.M; Feelisch, M. et al. Mechanisms of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress. *Anais of the New York Academic of Sciences*, v. 899, p.209-21, 2000.

Faes M,R; Caldas-Bussiere, M.C; Viana, K.S. et al. Nitric oxide regulates steroid synthesis by bovine antral granulosa cells in a chemically defined medium. *Animal Reproduction Science*, v.110, p.222–236, 2009.

Fair, T; Lonergan, P. The role of progesterone in oocyte acquisition of developmental competence. *Reproduction of Domestic Animals*, v.47 (Suppl. 4), p.142–147, 2012.

Foote,W.D; Thibault, C. Recherches experimentales sur la maturation in vitro des ovocytes de truie et de veau. *Ann Biology Animal Biochemistry Biophysical*, v.3, p.329-349, 1969.

Fujii, J; Iuchi, Y; Okada, F. Fundamental role of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive systems. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.3, p.43–52, 2005.

Gasperin, B.G; Barreta, M.H; Santos J.T. et al. Oil-free culture system for in vitro bovine embryo production. *Italian Journal of Animal Science*, v.9, p.169-172, 2010.

Gill, A; Jamnongjit, M;Hammes, S.R. Androgens promote maturation and signaling in mouse oocytes independent of transcription: a release of inhibition model for mammalian oocyte meiosis. *Molecular Endocrinology*, v.18, p.97–104, 2004.

Giometti, I.C; Bertagnolli, A.C; Ornes, R.C. et al. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. *Theriogenology*, v.63, p.1014–1025, 2005.

Gottardi, F.P; Mingoti, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.33, p.82-94, 2009.

Graselli, F; Ponderato, N; Basini, G. et al. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide/cyclic GMP pathway in swine granulosa cells. *Domestic Animal Endocrinology*, v.20, p.241–52., 2001.

Hattori, M; Nishida, N; Takesue, K. et al. FSH suppression of nitric oxide synthesis in porcine oocytes. *Journal of Molecular Endocrinology*, v.24, p.65–73, 2000.

Holt, J.E; Jones, K.T. Control of homologous chromosome division in the mammalian oocyte. *Molecular Human Reproduction*, v.15, p.139–147, 2009.

Hurk, R.V.D; Zhao, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v.63, p.1717–1751, 2005.

Hyttel, P; Fair, T; Callesen, H; Greve T. Oocyte growth capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, v.47, p.23-32, 1997.

Ignarro, L.J. Nitric oxide, biology and pathobiology. San Diego, Estados Unidos: Academic Press, 2000.

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, p.460–80, 1997.

Jablonka-Shariff, A; Olson, L. M. Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus–oocyte complexes *in vitro*. *Molecular reproduction and Development*, v. 55, p. 412–21, 2000.

Jablonka-Shariff, A; Olson, L.M. The role of nitric oxide in meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knockout mouse oocytes. *Endocrinology*, v. 139, p. 2944–54, 1998.

Jamnongjit, M; Gill, A; Hammes S.R. Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation.

Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, v.102, p.16257-62, 2005.

Kastrop, P.M.M; Bervers, M.M; Destrée, O.H.J. et al. Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.90, p.305-310, 1990.

Kim, J; Burghard, R.C;Wu, G: et al. Select Nutrients in the Ovine Uterine Lumen. IX. Differential Effects of Arginine, Leucine, Glutamine, and Glucose on Interferon Tau, Ornithine Decarboxylase, and Nitric Oxide Synthase in the Ovine Conceptus. *Biology of Reproduction*, v.84, p.1139–1147, 2011.

Knight, P.G; Glister C. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction*, v.121, p.503–512, 2001.

Kusano, T; Berberich, T; Tateda, C; Takahashi, Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, v.228, p.367–381, 2008.

Le Beaux, G; Richard, F.J; Sirard, M.A. Effect of cyclohexamide, 6-DMAP, roscovitine and butyrolactone I on resumption of meiosis in porcine oocytes. *Theriogenology*, v.60, p,1048-1058, 2003.

Lewis, R.S; Tamir, S; tannenbaum, S.R. et al. Kinetic analysis of the fate of oxide nitric synthesized by macrophages in vitro. *Journal Biology and Chemistry*, v.270, p.29350-29355, 1995.

Liu, M. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.9, p.149, 2011.

Luciano, A.M; Lodde, V; Beretta, M.S. et al. Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-culture system with intact cumulus–oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 30,50-monophosphate, and glutathione. *Molecular Reproduction and Development*, v.71, p.389–97, 2005.

Luciano, A.M; Lodde, V; Franciosi, F. et al. Progesterone receptor membrane component 1 expression and putative function in bovine oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development. *Reproduction*, v.140, p.663–672, 2010.

Luciano, A.M; Modina, S; Vassena, R. et al. Role of intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during *in vitro* maturation of bovine oocyte. *Biology of Reproduction*, v.70, p.465–472, 2004.

Machalcova, M; Krausova, K; Josekova, E. et al. Developmental of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. *Theriogenology*, v.6, p.329-335, 2004.

Matta, S.G. Papel do óxido nítrico na maturação *in vitro* de oócitos bovinos, Campos dos Goytacazes (RJ), dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Setembro, 2001.

Matta, S.G; Caldas-Bussiere, M.C; Viana, K.S. et al. Effect of inhibition of synthesis of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide by aminoguanidine on the *in vitro* maturation of oocyte–cumulus complexes of cattle, *Animal Reproduction Sciences*, v.111, p.189–201, 2009.

Mehlmann, L.M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, v.130, p.791–9, 2005.

Michel, T; Feron, O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *Journal of Clinical Investigation*, v.100, p.2146 –52, 1997.

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. *Human Reproduction*, v.19, p.30–40, 2004.

Moncada, S. Palmer, R.M.J; Higgs, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacological Reviews*, v.43, p.109–42, 1991.

Moor, R.M; Mattioli, M; Ding, J; Nagai, T. Maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.40, p.197-210,1990.

Motola, S; Popliker, M;Tsafriri, A. Are steroids obligatory mediators of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin-triggered resumption of meiosis in mammals? *Endocrinology*, v.148, p.4458–4465, 2007.

Nakamura, Y; Yamagata, Y; Sugino, N. et al. Nitric Oxide Inhibits Oocyte Meiotic Maturation. *Biology of Reproduction*, v.67, p.1588–1592, 2002.

Nathan, C; Xie, Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, v.78, p.915–918, 1994.

Pan, Z; Zhang, J; Li Q. et al. Current advances in epigenetic modification and alteration during mammalian ovarian folliculogenesis. *Journal of Genetics and Genomics*, v.39, p.111-123, 2012.

Pandey, A.N; Tripathi.A; Premkumar, K.V. et al. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, v.111, p.521-528, 2010.

Pawan, K.D; Vrajesh, T; Ram, P.S. et al. Expression of nitric oxide synthase isoforms in different stages of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian follicles: Effect of nitric oxide on in vitro development of preantral follicle. *Theriogenology*, v.77, p. 280-291, 2012.

Pincton, H; Briggs, D; Gosden, R. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.145, p. 27-37, 1998.

Pincus, G; Enzmann, E.V. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I, the activation of ovarian eggs. *The Journal of Experimental Medicine*, v.62, p. 665-75, 1935.

Pires, P.R.L; Santos, N.P; Adona, P.R. et al. Endothelial and inducible nitric oxide synthases in oocytes of cattle. *Animal Reproduction Science*. v.119, p.233-243. 2009.

Richard, F.J; Sirard, M.A. Effects of follicular cells on oocyte maturation, I: Effects of follicular hemisections on bovine oocyte maturation in vitro. *Biology of Reproduction*. v.54, p.16-21. 1996.

Richard, F,J; Sirard, M,A. Effects of harvest methods of bovine oocytes co-cultured with follicular hemisections in vitro on nuclear maturation. *Theriogenology*. v.46, p.1243-1250. 1996.

Rubbo, H; Darley-Usmar, V; Freeman, B.A. Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chemical Research in Toxicology*. v.9, p.809–820. 1996.

Schwarz, K.L. O oxido nítrico e os nucleotídeos cíclicos em oócitos bovinos maturados *in vitro*. Pirassununga (SP), Tese de doutorado. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo, 2011.

Schwarz, K.R.L; Pires P.R.L; De Bem T.H.,C. Consequences of nitric oxide synthase inhibition during bovine oocyte maturation on meiosis and embryo development. *Reproduction of Domestic Animals*. v.45, p.75-80. 2010.

Schwarz, K.R.L; Pires, P.R.L; Adona, P.R. et al. Influence of nitric oxide during maturation on bovine oocyte meiosis and embryo development *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*. v.20, p,529–36. 2008.

Sela-Abramovich, S; Galiani, D; Nevo, N. et al. Inhibition of rat oocyte maturation and ovulation by nitric oxide: mechanism of action. *Biology of Reproduction*, v.78, p.1111–8, 2008.

Sirard, M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, v.55, p.1241-1254. 2000.

Sirard, M.A; Coenen, K; Bilodeau, S. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology*, v.37, 1992.

Sirard, M.A; Florman, H.M; Leibfried-Rutledge, M.L. et al. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocyte. *Biology of Reproduction*, v.40, p.1257-1263, 1989.

Sirard M.A; Coenen K. The co-culture of cumulus-enclosed bovine oocytes and hemisections of follicles: effects on meiotic resumption. *Theriogenology*, v.40, p. 933-942, 1993.

Sirard, M, A; Richard, F; Blondin, P, et al, Contribution of the oocyte to embryo quality, *Theriogenology*, v. 65, p. 126-36, 2006..

Sirard, M.A; Parrish, J.J; Ware, C.B. et al. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biology of Reproduction*, v.39, p.546–552,1988.

Stefanello, J.R; Barreta, M.H; Porciuncula, P.M. et al. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte

maturation and embryo development. *Theriogenology*, v.66, p.2068–2076, 2006.

Sun, Q-Y; Miao, Y-L; Schatten, H. Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. *Cell Cycle*, v.8, p.2741-2747, 2009.

Takesue, K; Tabata, S; Sato, F. et al. Expression of nitric oxide synthase-3 in porcine oocytes obtained at different follicular development. *Journal of Reproduction and Development*, v.49, p.135–40, 2003.

Tao, Y; Fu, Z; Zhang, M.J. et al. Immunohistochemical localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in porcine ovaries and effects of NO on antrum formation and oocyte meiotic maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.222, p.93–103, 2004.

Tao, Y; Xie, H.R; Hong, H.Y. et al. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on porcine oocyte meiotic maturation. *Zygote*, v.13, p.1–9, 2005.

Tarazona, A.M; Rodriguez, J.L; Restrepo, L.F. et al. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro*. *Reproduction of Domestic Animals*, v.41, p.5-11, 2006.

Tesfaye, D; Kadanga, A; Rings, F. et al. The effect of nitric oxide inhibition and temporal expression patterns of their RNA and protein products of nitric oxide synthase genes during *in vitro* development of bovine pre-implantation embryos. *Reproduction of Domestic Animals*, v.41, p.501–9, 2006.

Tripathi, A; Khatun, S; Pandey, A.N. Intracellular levels of hydrogen peroxide and nitric oxide in oocytes at various stages of meiotic cell cycle and apoptosis. *Free Radical Research*, v.43, p.287-294, 2009.

Tsafiriri, A; Motola, S. Are steroids dispensable for meiotic resumption in mammals? *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v.18, n.8, 2007. Está faltando as páginas

Tsafiriri, A; Cao, X; Ashkenazi, H. et al. Resumption of oocyte meiosis in mammals: on models, meiosis activating sterols, steroids and EGF-like factors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 234, p. 37–45, 2005.

Van Tol, H.T; Bevers, M.M. Partial characterization of the factor in theca-cell conditioned medium that inhibits the progression of FSH-induced meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to the membrana granulosa. *Molecular Reproduction and Development*, v.60, p.418-424, 2001.

Van Tol, H.T.A; Bevers, M.M. Theca cells and theca-cell conditioned medium inhibit the progression of FSH-induced meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. *Molecular Reproduction and Development*, v.51, p.315–321, 1998.

Van Voorhis, B.J; Moore, K; Strijbos, P.J.L. et al. Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary. *Journal of Clinical Investestigation*, v.96, p.2719–26, 1995.

Viana, K.S; Caldas-Bussiere, M.C; Faes, S.G.C. et al. Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Animal Reproduction Science*, v.102, p.217–227, 2007.

Viana, K.S; Caldas-Bussiere, M.C; Paes de Carvalho, C.S, et al. Efeito de diferentes formas de cultivo na ação do óxido nítrico na maturação e na integridade da membrana plasmática de complexos cumulus-oócito em bovinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.48, p.147-154, 2011.

Webb, R; Garnsworthy, P.C; Gong, J.G. et al. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*, v.82, p.63-74, 2004.

Wink, D.A; Mitchell, J.B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanism of oxide nitric. *Free Radicals Biology and Medicine*, v.25, p.434-456, 1998.

Wu, G. Pond, W.G; Flynn, S.P. et al. Maternal dietary protein deficiency decreases nitric oxide synthase and ornithine decarboxylase activities in placenta and endometrium of pigs during early gestation. *Journal of Nutrition*, v.128, p.2395–2402, 1998.

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

Yamashita, Y; Shimada, M; Okazaki, T. et al. Production of progesterone from de novo-synthesized cholesterol in cumulus cells and its physiological role during meiotic resumption of porcine oocytes. *Biology of Reproduction*, v.68, p.1193–1198, 2003.

Yan, L; Lamb, R.F. Signalling by amino acid nutrients. *Biochemical Society Transactions*, v.39, p.443–445, 2011.

Zamberlam, G.O; Portela, V; de Oliveira, J.F.C. et al. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in bovine ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.335, p.189–194, 2011.

Zhang, M; Ouyang, H; Xia, G. The signal pathway of gonadotrophins induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Molecular Human Reproduction*, v.15, p.399–409, 2009.

Zsombor, L; Eszter, P; Atilla, C. et al. Mitochondrial NO and reactive nitrogen species production: Does mtNOS exist?. *Nitric Oxide, Biology and Chemistry*, v.14, p.162-168, 2005.

**ARTIGO SUBMETIDO PARA O ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA
VETERINARIA E ZOOTECNIA (ABMVZ)**

**Efeito do co-cultivo de complexos *cumulus*-oócitos bovinos com hemi-seções da
parede folicular na maturação *in vitro***

**The effect of co-culturing bovine *cumulus*-oocyte complexes with follicular-wall
hemi-sections on *in vitro* maturation**

**D.F. Dubeibe;¹ M.C. Caldas-Bussiere;^{1*} V.L. Maciel JR;¹ W.V. Sampaio;¹ C.R.
Quirino;¹ P.B. Gonçalves.²**

¹LRMGA/CCTA/Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, RJ

²Universidade Federal de Santa Maria, RS

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: claracal@uenf.br (M.C. Caldas-Bussiere)

RESUMO

Objetivou-se no presente trabalho, avaliar o efeito do co-cultivo de hemi-seções (HS) da parede folicular nas características físicas dos complexos *cumulus*-oócitos (CCOs). Folículos de 3 a 8 mm foram dissecados de ovários de matadouro, seccionados pela metade e levados ao meio de maturação [200 µL de TCM 199/BSA (0,04g/mL)]. Os CCOs foram recuperados do restante dos ovários e divididos em dois grupos para serem co-cultivados com 0 (controle) ou 8 HS por 22 h a 38,5°C e 5% de CO₂. O estágio de maturação nuclear e a integridade da membrana dos oócitos e das células do *cumulus* (CCs) foram avaliados pela coloração de orceína 2% e coloração dupla de hoechst 33342 (10µg/mL) e iodeto de propídeo (10µg/mL), respectivamente. O grau de expansão das CCs foi avaliado subjetivamente. A proporção de CCs com membrana lesada (P<0,05) foi menor nos CCOs co-cultivados com 8 HS de parede folicular, comparada ao controle (34,33±8,33 vs 58,33±5,85, respectivamente). Oócitos co-cultivados com 8 HS apresentaram inibição parcial do rompimento da vesícula germinativa e da progressão da meiose até metáfase II (39,9±23,8 e 8,4±6,5, respectivamente). No grupo controle o grau de expansão das CCs foi total (100%), enquanto que no grupo com 8 HS a expansão das CCs foi nula (0%). Estes resultados sugerem que as HS da parede folicular co-cultivadas com CCOs aumentam a integridade da membrana plasmática das CCs e inibem sua expansão. Estes dados sugerem que a comunicação bidirecional dos oócitos com as células do *cumulus* é mais efetiva e, portanto, o fator produzido pelas células da parede folicular que mantém o bloqueio meiótico, tenha uma maior possibilidade de exercer sua atividade no oócito via CCs.

Palavras-chave: Bovino, células foliculares, meiose, maturação do CCO *in vitro*

ABSTRACT

The object of the present work was to assess the effect of follicular wall hemi-sections (HS) co-culturing on the physical characteristics of *cumulus*-oocyte complexes (COCs). Follicles measuring 3-8 mm were dissected from ovaries obtained from a slaughterhouse, then cut in half and taken to the maturation medium [200 µL of TCM-199/BSA (0.04g/mL)]. COCs were retrieved from the remaining ovaries and separated

in two groups for co-culturing with 0 (control) or 8 HS for 22 h at 38.5°C and 5% CO₂. Nuclear maturation stage and membrane integrity of oocytes and *cumulus* cells (CCs) were assessed with 2% orcein stain and Hoechst 33342 double staining (10µg/mL) and propidium iodide (10µg/mL), respectively. The degree of *cumulus* cells expansion was subjectively observed. The proportion of CCs with injured membrane ($P < 0.05$) was lower for COCs co-cultured with 8 HS of follicular wall, as compared to control (34.33 ± 8.33 vs 58.33 ± 5.85 , respectively). Oocytes co-cultured with 8 HS presented partial inhibition of germinal vesicle breakdown and of meiotic progression up to metaphase II (39.9 ± 23.8 and 8.4 ± 6.5 , respectively). The control group had full (100%) CCs expansion, whereas the group with 8 HS had no (0%) CCs expansion. These results suggest that HS of follicular wall co-cultured with COCs increases CCs plasma membrane integrity and inhibits its expansion. These data suggest that bidirectional communication between oocytes and *cumulus* cells is likely to be more effective, and the factor produced by follicular wall cells, which maintains meiotic arrest, is more likely to exercise its activity in oocytes via CCs.

Keywords: bovine, follicular cells, meiosis, *in vitro* COC maturation

INTRODUÇÃO

A retomada da meiose dos oócitos *in vivo* ocorre no final do processo da maturação, após o pico do hormônio luteinizante (LH) (Mehlman, 2005). Contudo, oócitos bovinos meioticamente competentes que são retirados do ambiente folicular e cultivados *in vitro*, espontaneamente reiniciam o ciclo celular meiótico (Pincus e Enzmann, 1935). Por outro lado, quando co-cultivadas com oócitos, as hemi-seções (HS) de parede folicular parcialmente recriam o efeito inibitório na maturação nuclear (Sirard e Coenen, 1993). Isto evidencia que parte dos fatores responsáveis por manter o bloqueio meiótico nos oócitos são produzidos pelas células somáticas que compõem a parede do folículo.

Foote e Thibault (1969) publicaram um dos primeiros trabalhos testando as consequências do co-cultivo de células foliculares na maturação de COCs bovinos e observaram o mesmo efeito inibitório na meiose dos oócitos. Foi demonstrado que as células da teca são responsáveis pela produção do fator inibitório (Richard e Sirard,

1996), porém as células da granulosa podem participar ativamente da sua síntese ou ativação (Van Tol e Bevers, 1998).

Entretanto, a natureza deste(s) fator(es) não é completamente conhecida. Os oócitos podem responder a uma proteína de 214 KD produzida pelas células da teca (Richard e Sirard, 1998), ou a uma molécula polar, estável, com peso molecular menor que 5 KD. Contudo, não é um peptídeo, nem um esteróide, nem uma pequena molécula hidrofóbica (Van Tol e Bevers, 1998).

O mecanismo inibitório utilizado pelo fator produzido nas células foliculares é desconhecido, no entanto este poderia incluir efeitos diretos nas células do *cumulus*, uma vez que as células que rodeiam o oócito mantêm uma comunicação estreita com o oócito por meio das junções comunicantes (*gap*) existentes entre as projeções transzonais das células da corona radiata (Albertini *et al.*, 2001), e dessa maneira, participam ativamente na transmissão dos sinais inibitórios pelos quais os oócitos são mantidos em estágio de vesícula germinativa antes do pico de LH (Zhang *et al.*, 2009).

Dessa forma, este trabalho avaliou o efeito do co-cultivo de HS de parede folicular na maturação nuclear, integridade de membrana plasmática dos oócitos e células do *cumulus* e o grau de expansão das células do *cumulus* de CCOs bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados foram da Sigma-Aldrich Co. LLC. (EUA), exceto os mencionados. Ovários de vacas foram obtidos de abatedouros locais. Com o auxílio de pinças cirúrgicas e tesouras estéreis foi realizada a dissecação dos folículos de 3 a 8 mm retirando a totalidade do estroma ovariano. Depois de dissecados por completo, os folículos foram cortados ao meio com uma lâmina de bisturi. O meio de lavagem utilizado foi o meio de cultivo de tecidos 199 (TCM 199 – HEPES) acrescido de 0.4% de albumina sérica bovina (BSA) isenta de ácidos graxos FAF, 0.2 mM de piruvato, 100 UI/mL penicilina G potássica, sulfato de estreptomicina 50 µg/mL). As HS foram transferidas para placas de 4 poços (NUNC[®], EUA) com 200 µL de meio de maturação [TCM 199 suplementado com 0.4% de BSA isenta de ácidos graxos (FAF), 0.5 µg/mL de FSH (Folltropin-V[®], Bioniche Life Science Inc, Canadá), 5 µg/mL de LH (Lutropin-V, Bioniche Life Science Inc, Canadá) 0.2 mM de piruvato e antibióticos] pré-aquecido e pré-gasificado em estufa de CO₂.

Folículos de 3-8 mm foram aspirados usando seringa de 5 mL e agulha calibre 18 Gx1¹/₂ (40x12) e os CCOs coletados imediatamente colocados em meio TCM lavagem suplementado com 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, 0.5 mM) para mantê-los no estágio de vesícula germinativa (Eppig e Downs, 1984). Somente os CCOs que apresentaram mais de três camadas de células do *cumulus* e ooplasma homogêneo foram selecionados e transferidos para as placas que já continham as HS das paredes foliculares. O cultivo foi realizado durante 22 h em estufa com 5% de CO₂, 38°C e umidade saturada.

Após o período de cultivo, os oócitos foram inicialmente desnudados mediante pipetagens repetidas numa solução de PBS com 0.1% de PVA, posteriormente montados entre lâmina e lamínula, fixados em solução 3:1 de etanol-ácido acético (Merck S.A. Indústrias, Brasil), durante um período mínimo de 24 h e por fim corados com orceína acética 2%. A avaliação do estágio de maturação nuclear de cada oócito foi feita com auxílio de microscópio invertido (400x, NIKON - Eclipse TE300/TE200, EUA). Os oócitos foram classificados dependendo do estágio de maturação nuclear em: vesícula germinativa (VG), metáfase I (MI), anáfase I-telófase I (A-T) e metáfase II (MII).

Para observação da integridade da membrana plasmática foi utilizada uma marcação dupla com corantes fluorescentes: hoechst 33342, que cora as células com membrana íntegra (coloração azul) e iodeto de propídeo (IP), que marca as células com membrana lesada (coloração vermelha). Os oócitos e as células do *cumulus* foram avaliados de forma separada, e expostos por 5 min a cada um dos corantes, posteriormente colocados entre lâmina e lamínula, e analisados em microscópio de epifluorescência (400x, NIKON - Eclipse TE300/TE200, EUA).

O grau de expansão das células do *cumulus* foi avaliado usando um método subjetivo (Tao *et al.*, 2005). Grau 0: ausência de expansão; Grau 1: expansão mínima; Grau 2: expansão das camadas de células mais externas; Grau 3: expansão de todas as camadas com exceção das células da corona radiata; Grau 4: expansão de todas as camadas celulares.

Os CCOs selecionados foram aleatoriamente divididos em grupos de 20 para serem cultivados em 200 µL de meio de maturação sem HS foliculares (controle) ou junto com 2 HS de parede folicular para cada 50µL de meio (Richard e Sirard, 1996). Após o período de cultivo (22 h), foram avaliados os parâmetros de estágio de maturação nuclear dos oócitos, integridade de membrana dos oócitos e das células do

cumulus e grau de expansão das células do *cumulus*. Cada experimento foi repetido de 4 a 6 vezes.

Para todos os parâmetros avaliados foi realizado análise de variância (ANOVA) e as comparações entre médias foram efetuadas pelo teste *t* a um nível de significância de 5%. Para as variáveis que apresentaram coeficiente de variação maior que 30% foi realizada a transformação dos dados (log+1 e arcoseno).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de HS durante a maturação dos CCOs afetou o estágio de maturação nuclear dos oócitos às 22h de cultivo (Tab. 1). O grupo de CCOs co-cultivados com 8 HS apresentou uma maior proporção de oócitos nos estádios de VG, MI e A-T. Uma maior percentagem de oócitos do grupo controle se encontrava em MII ($79.7 \pm 9.8\%$) quando comparada ao grupo com HS ($8.4 \pm 6.5\%$).

Outros estudos na espécie bovina têm evidenciado o mesmo efeito. Giometi *et al.* (2005) observaram que 29,1% dos oócitos maturados em presença de HS da parede folicular, atingiram o estágio de MII às 18 h de cultivo *in vitro*. Da mesma maneira, Stefanello *et al.* (2006) observaram um retardo no rompimento da vesícula germinativa, na formação da primeira placa metafásica e na progressão até metafase II em oócitos maturados em presença de HS e avaliados às 7, 15 e 22 h de cultivo, respectivamente.

Estes resultados também foram descritos em outras espécies de mamíferos. A inibição do rompimento da vesícula germinativa e da progressão da meiose pela presença das HS de parede folicular tem sido observada em oócitos de ovinos (Moor e Trouson, 1977), suínos (Tsafri *et al.*, 1975) e eqüinos (Hinrich *et al.*, 1995; Tremoleda *et al.*, 2003).

Richard e Sirard (1996) obtiveram uma maior proporção de oócitos com bloqueio da meiose (58%) depois de 24 h de cultivo em presença de HS. Esta diferença em relação aos resultados obtidos no presente experimento pode ser explicada pelo uso de outras condições de cultivo nos demais trabalhos. Embora a proporção de 2 HS para cada 50 μL de meio de maturação tenha sido mantida, estes autores cultivaram os 10 oócitos em gotas com 50 μL de volume, enquanto que no presente experimento foram cultivados 20 oócitos em poços com 200 μL , fazendo com que a distância entre os CCOs e as HS da parede folicular fosse maior. No mesmo estudo, Richard e Sirard (1996) observaram que o contato direto dos CCOs com as células da parede folicular

não foi necessário para bloquear a meiose, mas o aumento da distância entre os COCs e as paredes foliculares pode reduzir o efeito inibitório na maturação nuclear.

Tabela 1. Efeito do co-cultivo de 8 hemi-seções (HS) da parede folicular de complexos *cumulus*-oócito (COCS) bovinos no estágio de maturação nuclear de oócitos após 22 h de cultivo.

	Estádios de maturação nuclear			
	VG	MI	A-T	MII
Controle	0 ^b	12,9±10,1 ^b	7,3± 6,8 ^b	79,7±9,8 ^a
Co-cultivo com HS	33,9±23,8 ^a	29,9±18,1 ^a	27,6±10,7 ^a	8,4±6,5 ^b

Médias±DP de 6 replicatas, 20 CCOs por tratamento (n=120). Letra diferente dentro da mesma coluna significa que houve diferenças (P<0,05). Vesícula germinativa (VG), metáfase I (MI), A-T (anáfase I – telófase I), metáfase II (MII).

A inibição da maturação nuclear foi parcial, 33,9% dos oócitos cultivados com HS permaneceram em estágio de VG, 66% conseguiram retomar a meiose, mas somente 8,6% dos oócitos atingiram o estágio de MII. Sirard *et al.* (1992) observaram que a sensibilidade dos oócitos aos diferentes inibidores da maturação poderia ser modulada durante a foliculogênese, pois a mesma concentração de um modulador ativo usado em oócitos em diferentes etapas do desenvolvimento folicular gera respostas diferentes. O efeito do fator produzido pelas células das paredes foliculares poderia promover a mesma resposta, visto que no presente experimento foram utilizados oócitos oriundos de folículos que se encontravam em diversos estádios de desenvolvimento (3-8 mm de diâmetro). Dessa maneira, poderiam ter respondido heterogeneamente ao fator inibitório presente no meio (Sirard e Coenen, 1993).

De acordo com as observações de Richard e Sirard (1996), o contato direto dos CCOs com as células da parede folicular não foi necessário para manter o bloqueio meiótico e diminuir a percentagem dos oócitos que alcançaram a MII. Somente a presença das HS no meio de cultivo dos CCOs foi suficiente para reproduzir esse efeito. Segundo Richard e Sirard (1996), os oócitos respondem a um fator que se solubiliza no meio de cultivo e, a proporção de 2 HS para cada 50 µL de meio de

maturação gera uma quantidade de fator suficiente com capacidade de interferir na retomada e progressão da meiose. Por outro lado, Tremoleda *et al.* (2003) afirmaram que a maturação nuclear dos oócitos eqüinos também é inibida pela presença de células foliculares no cultivo, principalmente células da teca, mas que o estreito contato com os CCOs é indispensável. Podem existir diferenças entre espécies na natureza e solubilidade do fator inibitório no meio de cultivo ou na quantidade de tecido folicular necessária para recriar a inibição em sistemas de cultivo *in vitro*.

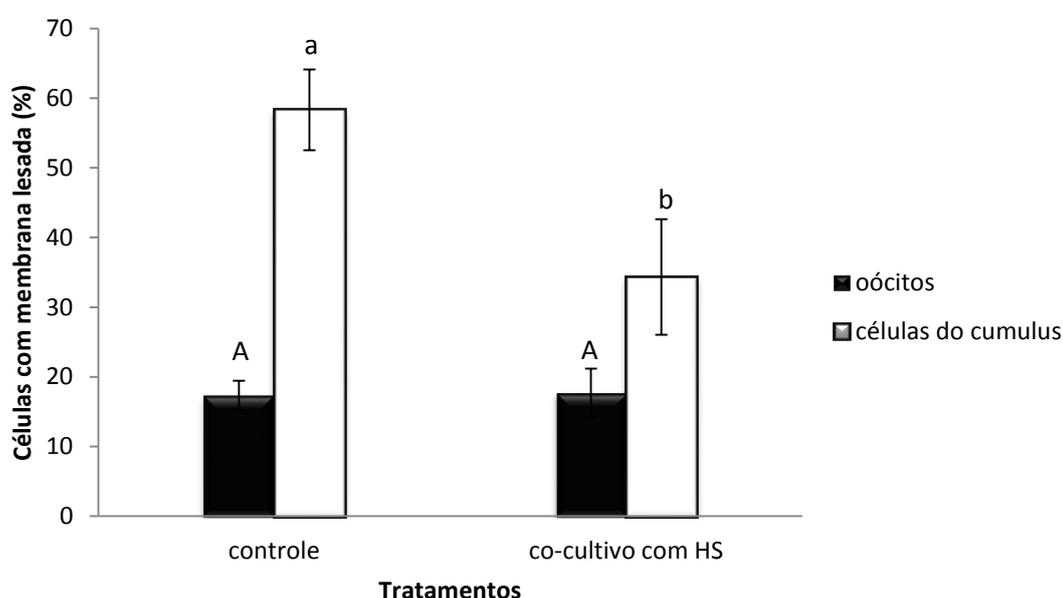


Figura 1. Efeito da presença de 8 hemi-seções (HS) de parede folicular durante a maturação *in vitro* de CCOs bovinos, sobre a integridade (%) de membrana plasmática dos oócitos e das células do *cumulus* (CCs) às 22 h de cultivo. Valores na coluna preta representam média±DP de 4 replicatas, 20 oócitos por tratamento (n=80). Valores na coluna branca representam média±DP de 6 replicatas, 200-250 CCs por tratamento (n=1380) Letra diferente entre colunas da mesma cor indicam diferenças (P<0,05).

A retomada da meiose *in vivo* é consequência dos efeitos diretos que o LH exerce nos seus receptores presentes nas células da parede folicular (Nuttinck *et al.*, 2004). As células foliculares responsivas ao LH estavam presentes no cultivo dos oócitos. O meio

de maturação foi suplementado com gonadotrofinas (FSH e LH), e mesmo assim efeito inibitório na maturação nuclear se manteve. A presença de gonadotrofinas no meio de maturação não supera o efeito inibitório gerado pelas células foliculares (Richard e Sirard 1996; Van Tol e Bevers, 1998; Stefanello *et al.*, 2006) indicando que possivelmente outras vias participam do mecanismo inibitório em condições *in vitro*.

Nenhum dos estudos realizados para esclarecer a origem, natureza ou mecanismo de ação do fator produzido pelas HS foliculares, tem analisado seus efeitos na integridade da membrana plasmática dos oócitos ou das células do *cumulus*, nem no grau de expansão das células do *cumulus*.

Neste estudo foi observado que o co-cultivo dos CCOs com HS de parede folicular não teve efeito na integridade da membrana plasmática dos oócitos, no entanto os CCOs co-cultivados com HS de parede folicular apresentaram uma porcentagem de células do *cumulus* com membrana plasmática lesada menor ($34,33 \pm 8,33$) quando comparada ao grupo controle ($58,33 \pm 5,85$) (Fig. 1).

Todos os CCOs co-cultivados com HS de parede folicular apresentaram ausência de expansão das células do *cumulus* (grau 0), enquanto, 100% dos CCOs do grupo controle apresentaram grau de expansão máxima (grau 4) (Tab.2).

A compactação das camadas de células do *cumulus* poderia ter uma relação direta com a proporção de células com membrana plasmática lesada. Fatores de crescimento (GDF9, BMP15, 6 ou 7) produzidos pelo próprio oócito têm a capacidade de proteger as células do *cumulus* (Hussain *et al.*, 2005). As camadas de células compactas e em estreito contato com o oócito teriam a possibilidade de receber esses fatores de forma mais adequada por meio das junções intercomunicantes e desmossomos (Albertini *et al.*, 2001), do que aquelas que sofreram expansão e retração das projeções transzonais.

A preservação da comunicação entre as células do *cumulus* e entre as projeções transzonais das células da corona radiata e o oócito, é essencial para manter o bloqueio meiótico (Shimada, 2012). Uma extensa rede de junções comunicantes permite a transferência de substâncias provenientes das células somáticas, que são necessárias para manter elevadas concentrações intra-ocitárias de nucleotídeos (AMPc) (Dekel, 2005) e dessa forma, mantêm o oócito em estágio de vesícula germinativa. Por outro lado, *in vivo*, a resposta ao pico de LH inclui a expansão das camadas das células do *cumulus* e o rompimento da comunicação intercelular (Sela-ibramovich *et al.*, 2005). O fechamento das junções intercomunicantes está associado à redução na concentração de AMPc intra-ocitário, e conseqüentemente, ao reinício da meiose (Sela-ibramovich *et*

al., 2006). O(s) fator(es) gerado(s) nas paredes foliculares possivelmente faz parte das substâncias que utilizam as células do *cumulus* como via para atingir o oócito e exercer seu efeito inibitório na maturação nuclear.

Tabela 2. Efeito da presença de 8 hemi-seccoes (HS) de parede folicular durante a maturação *in vitro* de CCOs bovinos, sobre o grau de expansão das células do *cumulus* (CCs) às 22 h de cultivo.

	Grau de expansão				
	0	1	2	3	4
Controle	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^b
Co-cultivo com HS	100 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Médias±DP de 6 replicatas, 20 CCOs por tratamento (n=120). Letra diferente dentro da mesma coluna significa que houve diferenças (P<0,05).

Neste estudo foi observado que uma determinada proporção de CCOs conseguiu reiniciar a meiose e alcançar o estágio de MII, mesmo sem ter apresentado expansão das células do *cumulus*. Isto indica que a expansão das células do *cumulus* e a retomada da meiose, em alguns casos, podem acontecer como eventos independentes, desencadeados por vias/mecanismos diferentes (Luciano et al., 2004).

Os resultados do presente experimento, sugerem que substâncias liberadas pelas HS foliculares tem a capacidade de manter a comunicação intercelular nos CCOs e dessa forma favorecer a integridade das células do *cumulus*. Conseqüentemente, as células do *cumulus* com a funcionalidade preservada e mantendo a estreita comunicação com os oócitos, poder conduzir quantidades suficientes do fator responsável por manter o bloqueio meiótico e exercer seu efeito inibitório dentro dos oócitos.

CONCLUSÕES

As HS foliculares produzem substâncias que impedem a expansão das camadas de células do *cumulus* e que aumentam a integridade da sua membrana plasmática.

Investigações futuras são necessárias para confirmar se esses efeitos observados nas células do *cumulus* se relacionam com a capacidade inibitória do fator(es) originado(s) nas células somáticas que compõem a parede folicular e que tem a capacidade de manter parcialmente os oócitos em bloqueio meiótico ou impedir a progressão até o estágio de MII.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos técnicos do LRMGA (CCTA-UENF) Bruna Lomba Dias e Carla Sobrinho Paes de Carvalho pelo apoio durante o experimento. Esse trabalho teve apoio financeiro da FAPERJ (E-12/2011). Dubeibe, D.F. recebeu auxílio/bolsa da FAPERJ.

REFERÊNCIAS

ALBERTINI, D.F.; COMBELLES, C.M.H.; BENECCHI, E. e CARABATSOS M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*, v.121, p.647–653. 2001.

DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.234, p.19–25, 2005.

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

FOOTE, W.D.; THIBAUT, C. Recherches experimentales sur la maturation in vitro des ovocytes de truie et de veau. *Ann. Biol. Anim. Biochim; Biophys.*, v.3, p.329-349, 1969.

GIOMETTI, I. C.; BERTAGNOLLI, A. C.; ORNES, R. C. et al. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. *Theriogenology*, v.63, p.1014–1025, 2005.

HINRICHS, K.; MARTIN, M.G.; SCHMIDT, A.L.; FRIEDMAN P.P. Effect of follicular components on meiotic arrest and resumption in horse oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, v.104, p.149-156, 1995.

HUSSEIN, T.S.; FROILAND, D.A.; AMATO, F. et al. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J. Cell Sci.*, v.118, p.5257-5268, 2005.

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

MOOR, R.M.; TROUNSON, A.O. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J. Reprod. Fertil.*, v.49, p.101-109, 1977.

NUTTINCK, F.; CHARPIGNY, G.; MERMILLOD, P. et al. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.27, p.179-195, 2004.

PINCUS, G.; ENZMANN, E.V. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. the activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med.*, v.62, p.665-75, 1935.

RICHARD, F.J.; SIRARD, M.A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. I: Effects of follicular hemisections on bovine oocyte maturation in vitro. *Biol. Reprod.*, v.54, p.16-21, 1996.

SELA-ABRAMOVICH, S.; CHOREV, E.; GALIANI, D.; DEKEL, N. Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. *Endocrinology*, v.146, p.1236-1244, 2005.

SELA-ABRAMOVICH, S.; EDRY, I.; GALIANI, D. et al. Disruption of Gap Junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology*, v.147, p.2280–2286, 2006.

SHIMADA, M. Regulation of oocyte meiotic maturation by somatic cells. *Reprod. Med. Biol.*, v.11, p.177–184, 2012.

SIRARD M.A; COENEN K. The co-culture of cumulus-enclosed bovine oocytes and hemisections of follicles: effects on meiotic resumption. *Theriogenology*, v.40, p.933-942, 1993.

SIRARD, M.A.; COENEN, K.; BILODEAU S. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocyte. *Theriogenology*, v.37, p.39-57, 1992.

STEFANELLO, J.R; BARRETA, M.H; PORCIUNCULA, P.M. et al. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology*, v.66, p.2068–2076, 2006.

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

TREMOLEDA, J.L.; THARASANIT, T.; VAN TOL, H.T.A. et al. Effects of follicular cells and FSH on the resumption of meiosis in equine oocytes matured in vitro. *Reproduction*, v.125, p.565–577, 2003.

TSAFRIRI, A.; POMERANTZ, S.H.; CHANNING, C.P. Inhibition of Oocyte Maturation by porcine follicular fluid partial characterization of the inhibitor. *Biol. Reprod.*, v.14, p.511-516, 1976.

VAN TOL, H.T.A; BEVERS, M.M. Theca cells and theca-cell conditioned medium inhibit the progression of FSH-induced meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. *Mol. Reprod. Dev.* v.51, p.315–321, 1998.

ZHANG, M; OUYANG, H; XIA, G. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Mol. Hum. Reprod.*, v.15, p. 399–409, 2009.

ANEXO

LISTA PREPARAÇÃO DE MEIOS

I. Meio de maturação

Produto	Concentração	Quantidade
TCM 199		4845 µL
Piruvato	0,2 mM	50 µL
FSH		50 µL
LH	100 ng/mL	50 µL
BSA FAF (A-6003)	0,04 g/mL	0,02 gr
Penicilina/Streptomicina		5 µL

II. Meio de lavagem

Produto	Concentração	Quantidade
TCM 199		4845 µL
Piruvato	0,2 mM	50 µL
BSA FAF (A-6003)	0,04 g/mL	0,02 gr
Penicilina/Streptomicina		5 µL

III. Solução stock 3 - Isobutyl - 1- Methylxantine (IBMX)

Produto	Quantidade	Concentração stock
IBMX (sigma: I-5897)	0,022 g	10 mM
DMSO	10 mL	

III. 1. Solução uso 3 - Isobutyl - 1- Methylxantine (IBMX)

Produto	Quantidade	Concentração final
IBMX Solução stock	250 µL	0,5 mM
Meio lavagem	5 mL	

IV. Hoechst 33342

Produto	Solução stock	Quantidade	Concentração final
Hoechst 33342 (B-2261)	10 µg/mL	3 µL	20 µg/mL
Solução PBS/Soro	5% Soro	997 µL	

V. Iodeto de propídio (IP)

Produto	Solução stock	Quantidade	Concentração final
IP (P- 4170)	100 µg/mL	100 µL	10 µg/mL
Solução PBS/Soro	5% Soro	900 µL	

VI. Orceína acética 2%

Produto	Quantidade	Concentração final
Orceína (O7505)	1 g	2%
Ácido acético	30 mL	
Água destilada	20 mL	

VII. Solução mãe L- arginina

Produto	Quantidade	Concentração final
L-arginina (A-8094)	8,7 mg	500 mM
Meio maturação	100 µL	

VII 1. L-arginina 2,5 mM

Produto	Quantidade	Concentração final
Solução mãe	1 µL	2,5 mM
Meio maturação	200 µL	

VII 2. L-arginina 4 mM

Produto	Quantidade	Concentração final
Solução mãe	1,6 µL	4 mM
Meio maturação	200 µL	

VII 3. L-arginina 5 mM

Produto	Quantidade	Concentração final
Solução mãe	2 µL	5 mM
Meio maturação	200 µL	

VII 4. L-arginina 6 mM

Produto	Quantidade	Concentração final
Solução mãe	2,4 µL	6 mM
Meio maturação	200 µL	

VII 5. L-arginina 10 mM

Produto	Quantidade	Concentração final
Solução mãe	4 µL	10 mM
Meio maturação	200 µL	

VIII. Solução mãe (1) *N*_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME)

Produto	Quantidade	Concentração final
L-NAME (N5751)	7 mg	1000 mM
Meio maturação	25 µL	

VIII 1. L-NAME 10 mM

Produto	Quantidade	Concentração final
Solução mãe (1)	2 µL	10 mM
Meio maturação	200 µL	

VIII 2. L-NAME 5 mM

Produto	Quantidade	Concentração final
Solução mãe (1)	1 μ L	5 mM
Meio maturação	200 μ L	

VIII 3. L-NAME 2,5 mM

Produto	Quantidade	Concentração final
Solução mãe (1)	0,5 μ L	2,5 mM
Meio maturação	200 μ L	

IX. Solução mãe (2) *N_ω*-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME)

Produto	Quantidade	Concentração final
Solução mãe (1)	10 μ L	10 mM
Meio maturação	990 μ L	

IX 1. L-NAME 1 mM

Produto	Quantidade	Concentração final
Solução mãe (2)	20 μ L	1 mM
Meio maturação	200 μ L	

IX 2. L-NAME 0,5 mM

Produto	Quantidade	Concentração final
Solução mãe (2)	10 μ L	0,5 mM
Meio maturação	200 μ L	

IX 3. L-NAME 0,1 mM

Produto	Quantidade	Concentração final
Solução mãe (2)	2 μ L	0,1 mM
Meio maturação	200 μ L	