

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**NATÁLIA FERREIRA TORRES**

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL/ÓXIDO  
NÍTRICO NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS**

**CAMPOS DO GOYTACAZES**

**JULHO 2015**

**NATÁLIA FERREIRA TORRES**

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL/ÓXIDO  
NÍTRICO NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS**

**Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, na área de concentração de Reprodução e Melhoramento Genético Animal.**

**ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> MARIA CLARA CALDAS BUSSIÈRE**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES**

**JULHO 2015**

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL/ÓXIDO  
NÍTRICO NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS**

**NATÁLIA FERREIRA TORRES**

**Dissertação apresentada ao centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, na área de concentração de Reprodução e Melhoramento Genético Animal.**

**Aprovada em 13/07/2015,**

---

**Prof. Angelo José Burla Dias (Doutor, Ciência Animal) - UENF**

---

**Dr.(a) Clara Slade Oliveira (Doutora, Medicina Veterinária) - EMBRAPA**

---

**Dr.(a) Raquel Varella Serapião (Doutora, Ciência Animal) – PESAGRO-RIO**

---

**Prof<sup>a</sup>. Maria Clara Caldas Bussiere (Doutora, Fisiologia Animal) – UENF  
(Orientadora)**

Aos meus queridos avós Benony (in memorian),  
Neusa e Maria de Lourdes (in memorian), por terem sido sempre tão amáveis;

Aos meus amados pais Fátima Maria e Marco Antônio,  
por nunca medirem esforços para que meus sonhos se realizassem;

Ao meu namorado Marcos,  
por todo amor e paciência a mim dispensados.

***Dedico***

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente só tenho a agradecer a Deus, sem Ele em minha vida eu não seria nada;

À minha orientadora Prof(a) Dr.(a) Maria Clara Caldas Bussiere, por toda ajuda para execução desse trabalho, pelo apoio, pela dedicação e pelos conselhos, muito obrigada;

Ao professor Angelo José Burla Dias, por estar sempre presente, por sua disponibilidade para esclarecimentos e por suas colaborações;

Às técnicas Carla Sobrinho Paes de Carvalho e Bruna Lomba Dias, pela amizade, pelo auxílio indispensável para realização dos experimentos e pela dedicação, muito obrigada;

A Karina Nogueira, bolsista de IC, que me ajudou em todas as etapas de todos os experimentos, sua ajuda foi indispensável;

Aos amigos companheiros de laboratório: Aline Matos, Diego, Valter, Alinne Glória, Laura, Janaina, Géster, Jefferson e Róger, pela amizade, pelo apoio nas horas difíceis e companheirismo;

Obrigada aos meus pais Fátima e Marco e irmãos Rachel e Marquinho, que sempre estiveram muito presentes, e fizeram e fazem tudo por mim. Por me incentivarem e me apoiarem em todas as vezes que precisei;

Ao meu namorado Marcos Meireles, por estar ao meu lado em todos esses anos da graduação e mestrado, me ajudando, me dando conselhos, sendo compreensivo nos meus momentos de nervosismo. Obrigada por todas as idas ao matadouro e pela companhia nas noites no laboratório;

Agradeço também as minhas amigas da república: Aline, Camilla, Graziella, Letícia e Thaísa, por todas as ocasiões em que vocês se mostraram mais do que amigas;

Ao curso de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense, pela oportunidade concedida;

A fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo suporte financeiro deste trabalho e ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq pela concessão da bolsa de estudo;

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho, meu eterno agradecimento.

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi compreender os eventos que ocorrem durante a maturação na via iNOS/NO/GMPc. Foi verificada a adição de aminoguanidina (AG) (inibidor da isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintase -iNOS) e o 1*H*-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-*a*] quinoxalin-1-one (ODQ – inibidor da guanilato ciclase solúvel - GCs) na maturação de CCOs bovinos cultivados em presença de hemisseções (HS) da parede folicular. Primeiramente, foram avaliados após 22 horas de cultivo o estágio da maturação nuclear, a integridade da membrana plasmática das células do *cumulus*, a concentração de nitrato/nitrito e produção de progesterona (P<sub>4</sub>) e 17β-estradiol (E<sub>2</sub>). Adicionalmente, foi realizada a cinética de maturação às 7, 15 e 22 horas utilizando duas concentrações de AG (1 e 100 mM). Os controles consistiram de CCOs cultivados em presença (C-) ou ausência de HS (C+). As mensurações das concentrações de GMPc (30 COCs/tratamento) e AMPc (10 COCs/tratamento e 50 oócitos/tratamento) foram realizadas às 0, 1, 3, 6 e 9h para os CCOs e às 0, 3, 6 e 9h nos oócitos. Todos os dados foram avaliados segundo o teste de Tukey (P<0,05). No C- ocorreu diminuição da porcentagem de oócitos que alcançaram a metáfase II (MII) em relação ao grupo C+ (P<0,05). A adição de 1 e 100 mM de AG estimulou a retomada da meiose em relação ao C- (P<0,05) e foi igual ao C+ (P>0,05). O ODQ promoveu o desbloqueio da maturação, entretanto, apresentou 21,9±3,5% de oócitos que progrediram até a MII (P<0,05). Ao longo da cinética de maturação com AG foi observado que houve efeito dose resposta na retomada da meiose e progressão até MII. A concentração de GMPc nos CCOs diminuiu ao longo das horas avaliadas em todos os grupos experimentais, enquanto que a concentração de AMPc apresentou um aumento ao longo do tempo em todos os tratamentos (P<0,05), todavia o mesmo não ocorreu nos oócitos, onde a concentração desse nucleotídeo foi decrescente (P<0,05). A integridade da membrana das células do *cumulus* do grupo C+ foi maior do que a observada no C- e demais tratamentos com AG e ODQ (P<0,05). A concentração de nitrato/nitrito foi maior no C- e a adição de 1 mM de AG diminuiu esse efeito (P<0,05). A produção de P<sub>4</sub> foi maior no C- do que no C+ (P<0,05), mas não foi diferente nos demais tratamentos (P>0,05). A concentração de E<sub>2</sub> foi maior em relação ao C- (P<0,05). Os resultados permitem concluir que a atividade da via iNOS/NO/GMPc é importante para a manutenção do CCO no estágio de vesícula germinativa (VG) e progressão

da meiose até a MII, sendo modulada pelas concentrações de GMPc e do AMPc no COC/oócito e que a atividade da enzima iNOS está ligada a integridade das células do *cumulus*, a retomada e progressão da meiose até a fase de MII, dependendo da concentração utilizada.

Palavras-chave: meiose, óxido nítrico, inibição da maturação *in vitro*, aminoguanidina, nucleotídeo.

## ABSTRACT

The objective of this study was to understand the events that occur during maturation towards iNOS/NO/cGMP. It has been found that the addition of aminoguanidine (AG) (inhibitor of the inducible isoform of the enzyme nitric oxide synthase –iNOS) and 1H-[1,2,4] oxadiazol [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ – guanylate cyclase inhibitor – sGC) to the culture medium influence the maturing COCs cultured in the presence of bovine hemisections (HS) of the follicular wall. Were evaluated after 22 hours of culture: nuclear maturation stage, integrity of the plasma membrane of *cumulus* cells, the nitrite concentration and production and progesterone ( $P_4$ ) and  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ). The controls consisted of COCs cultured in the presence (C-) and absence of HS (C+). The measurement of cGMP concentration (30 COCs/treatment) and cAMP (10 COCs and 50 oocytes/treatment) were evaluated at 0, 1, 3, 6, 9h for COCs and 0, 3, 6, 9h in oocytes. All data were assessed by the Tukey test ( $P<0.05$ ). The C- decreased the percentage of oocytes that reached the metaphase II (MII) in relation to the C+ group ( $P <0.05$ ). Addition of 1 and 100 mM AG stimulate resumption of meiosis in relation to C- ( $P<0.05$ ) and was equal to C+ ( $P>0.05$ ). The ODQ promoted the release of maturation, however, had the lowest number of oocytes that have progressed to the MII ( $P <0.05$ ). The cGMP concentration decreased along the time evaluated in all experimental groups, while the concentration of cAMP in COCs showed an increase over time in all treatments ( $P<0.05$ ). The concentration of this nucleotide in the oocytes was descending ( $P<0.05$ ). The membrane integrity of cumulus cells C+ group was higher than that observed in C- and other treatments AG and ODQ ( $P<0.05$ ). The concentration of nitrate/nitrite was higher in C- and addition of 1 mM AG decreased this effect ( $P<0.05$ ). The production of  $P_4$  was higher on the C-than the C+ ( $P<0.05$ ) but is not different from the other treatments ( $P>0.05$ ). The concentration of  $E_2$  was higher compared to C- ( $P<0.05$ ). Subsequently was evaluated the effect of the addition of AG (1 and 100mM) along the culture (7, 15 and 22 hours) at meiosis, the membrane integrity of the cumulus cells and the production of  $NO_3^-/NO_2^-$  in the culture medium. Over the evaluated hours it was observed that there was dose-response effect in the resumption of meiosis and progression to MII. The integrity of cumulus cells C+ was higher than that observed in group C- and other treatments with AG during the three ratings (7, 15 and 22h) ( $P<0.05$ ). Regarding the dosage  $NO_3^-/NO_2^-$ , the C- group increased concentration on over the

time compared to C+ ( $P < 0.05$ ). The addition of AG doesn't alter the concentration of  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  compared to C-. The results allow us to conclude that the activity of the iNOS/NO/cGMP pathway is important for maintaining the COCs in the germinal vesicle stage (GV) and meiosis progression to the MII, being modulated by cGMP and cAMP concentrations in the COC/oocyte and that the activity of iNOS is connected to the integrity of cumulus cells, resumption of meiosis and progression to the MII stage, depending on the concentration used.

Keywords: meiosis, nitric oxide, inhibition of *in vitro* maturation, aminoguanidina, nucleotide.

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão de literatura

Figura 1. Esquema representativo da maturação *in vitro* de oócitos bovinos cocultivados em presença de hemisseções da parede folicular e o papel dos nucleotídeos cíclicos na maturação nuclear.....33

### Artigo

Figura 1. Estádio de maturação nuclear de oócitos bovinos ao longo das 7 (a), 15 (b) e 22 (c) horas de cultivo. ....74

Figura 2. Efeito da suplementação do meio de maturação com aminoguanidina e ODQ na cinética da produção de GMPc ( $\text{pmol mL}^{-1}$ ) de CCOs bovinos cultivados *in vitro*. ....75

Figura 3. Efeito da suplementação do meio de maturação com aminoguanidina e ODQ na cinética da produção de AMPc ( $\text{fmol mL}^{-1}$ ) de CCOs bovinos cultivados *in vitro*. ....76

Figura 4. Efeito da suplementação do meio de maturação com aminoguanidina ou ODQ na cinética da produção de AMPc ( $\text{fmol/mL}$ ) de oócitos bovinos cultivados *in vitro*. ....77

Figura 5. Efeito da adição de aminoguanidina (AG) e 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one(ODQ) na concentração de progesterona ( $P_4$ ) e 17 $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) no meio de maturação de CCOs cocultivados com hemisseções de parede folicular durante 22 horas. ....80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito dose-resposta da adição de Aminoguanidina (AG) na maturação nuclear de oócitos bovinos cultivados <i>in vitro</i> .....	71
Tabela 2: Efeito dose-resposta da adição de 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) na maturação nuclear de oócitos bovinos cultivados <i>in vitro</i> .....	72
Tabela 3: Efeito dose-resposta da adição de 8 Bromo-Guanosina 3'5'-monofosfato cíclico (8Br-GMPc)na maturação nuclear de oócitos bovinos cultivados <i>in vitro</i> .....	73
Tabela 4: Integridade de membrana das células do cumulus em função das concentrações de aminoguanidina e 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ).....	78
Tabela 5. Efeito da adição de aminoguanidina (AG) e 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one(ODQ) na produção de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ no meio de maturação <i>in vitro</i> de CCOs em presença de oito hemisseções (HS) de parede folicular.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc – Adenosina monofosfato cíclica  
AC – Adenilato ciclase  
AG - Aminoguanidina  
AT – Anáfase-Telófase  
BSA – Soro albumina bovina  
CCO – complexo *cumulus*-oócito  
CO<sub>2</sub> – Gás carbônico  
E<sub>2</sub> – 17β- Estradiol  
FSH – Hormônio folículo estimulante  
GC<sub>s</sub> – Guanilato ciclase soluvel  
GMPc – Guanosina 3' 5' – monofosfato cíclico  
HS - Hemissescções  
IBMX – 3 isobutil metil xantina  
LH – Hormônio luteinizante  
L-NAME – N<sup>W</sup>-nitro-L-arginina-metil éster  
MAPK – MAP cinase  
MIV – Maturação *in vitro*  
MI – Metáfase I  
MII – Metáfase II  
MPF – Fator promotor de maturação  
NaCl – Cloreto de sódio  
NO – Óxido nítrico  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – Nitrito  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – Nitrato  
NOS – Óxido nítrico sintase  
iNOS - Óxido nítrico sintase indizível  
eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial  
nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal  
ODQ - 1*H*-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-*a*] quinoxalin-1-one  
P<sub>4</sub> - Progesterona  
PDE – Fosfodiesterase  
PKA – Proteína cinase A

RE – Retículo endoplasmático

RVG – Rompimento da vesícula germinativa

SFB – Soro fetal bovino

SNAP – S-nitroso-N-acetilpenicilamina

SNP – Nitroprussiato de sódio

VG – Vesícula germinativa

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	17
2.1 OBJETIVO GERAL .....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
3.1 MATURAÇÃO OOCITÁRIA: NUCLEAR, CITOPLASMÁTICA E MOLECULAR .....	18
<b>3.1.1 Maturação nuclear</b> .....	18
<b>3.1.2 Maturação citoplasmática</b> .....	19
<b>3.1.3 Maturação molecular</b> .....	20
3.2 ÓXIDO NÍTRICO: ESTRUTURA, FUNÇÃO, SÍNTESE E INIBIÇÃO .....	21
3.3 ÓXIDO NÍTRICO NA MATURAÇÃO OOCITÁRIA .....	24
3.4 NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS E FOSFODIESTERASES.....	26
3.5 A FUNÇÃO DOS ESTEROIDES NA FISIOLOGIA REPRODUTIVA E NA MATURAÇÃO OOCITÁRIA .....	28
3.6 A IMPORTÂNCIA DO FOLÍCULO PARA MATURAÇÃO COMPLETA DO OÓCITO 30	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
PAPEL DA VIA iNOS/NO/GMP <sub>c</sub> NA MATURAÇÃO NUCLEAR <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS BOVINOS.....	44

## 1. INTRODUÇÃO

A maturação oocitária em mamíferos é um processo longo e complexo, o qual está sujeito a diversos mecanismos de controle. Esse evento consiste no fato do oócito completar a primeira divisão meiótica, sofrer alterações citoplasmáticas e progredir para a fase de metáfase II (TSAFRIRI e DEKEL, 2011; MEHLMANN, 2005).

A maturação nuclear é iniciada durante a vida fetal e fica bloqueada durante a vida neonatal até a puberdade, porém tem seu reinício durante cada ciclo reprodutivo após um aumento hormonal pré-ovulatório. Entretanto, os mecanismos pelos quais ocorre o controle da maturação ainda não foram completamente elucidados (BILODEAU-GOESEELS, 2007; TSAFRIRI e DEKEL, 2011), pois os eventos promotores da maturação são difíceis de serem estudados fora do seu ambiente fisiológico (MEHLMANN, 2005). Já foi demonstrado que o crescimento dos folículos junto ao desenvolvimento das várias camadas de células somáticas do CCO é de extrema importância para a formação de uma unidade fisiológica que irá responder a estímulos de maneira coordenada, a qual culminará na ovulação (TSAFRIRI e DEKEL, 2011).

O envolvimento do óxido nítrico (NO) na maturação *in vitro* de oócitos bovinos já foi evidenciado (MATTA et al., 2002; VIANA et al., 2007, 2011; SCHWARZ et al., 2014). Sua síntese é derivada da atividade das enzimas óxido nítrico sintase (NOS), as quais possuem três isoformas, duas são constitutivas (neuronal e endotelial) e a terceira forma é induzível. As principais diferenças entre as isoformas se relacionam com a duração da geração de NO e com a via de sinalização a qual está ligada nas diferentes células/tecidos (MONCADA, PALMER e HIGGS, 1989; IGNARRO, 2000).

O óxido nítrico foi descrito por diversos autores como sendo um mediador importante na fisiologia reprodutiva, o que foi demonstrado pela presença das três isoformas da NOS, endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS) nos tecidos ovariano e uterino (SENGOKU *et al.*, 2001).

A participação do NO durante o processo de maturação oocitária possui um papel controverso, uma vez que dependendo da concentração e da espécie estudada, essa substância pode atuar inibindo ou estimulando a maturação nuclear (PANDEY e CHAUBE, 2014). Em camundongos (HUO et al., 2005; Pandey et al.,

2010) e suínos (CHMELÍKOVÁ et al., 2010) foi demonstrado que a diminuição da concentração de NO induz à retomada da meiose. Por outro lado, em bovinos, a adição de inibidores da NOS no meio de cultivo inibe a retomada da meiose, assim como a adição de doadores de NO pode inibir ou estimular a retomada da meiose nessa espécie, dependendo da concentração utilizada. (BILODEAU-GOESEELS, 2007; SCHWARZ et al., 2014).

Visto que a(s) via(s) envolvidas na retomada e progressão da meiose dos oócitos de bovinos ainda não foi totalmente esclarecida, o objetivo do presente estudo foi simular *in vitro* as condições fisiológicas do ambiente folicular *in vivo* e compreender o papel do NO derivado da isoforma induzível – iNOS, na maturação de oócitos bovinos, por meio da adição de substâncias atuantes na via iNOS/NO/GMPc.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do sistema iNOS/NO/GMPc na maturação de oócitos bovinos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações da aminoguanidina (AG - inibidor da iNOS), 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ – inibidor da guanilato ciclase soluvel) e 8 Bromo-guanosina 3'5'-monofosfato cíclico (8-Br-GMPc – análogo do GMPc) na maturação de oócitos bovinos co-cultivados com hemisseções de folículos ovarianos;
- Avaliar o efeito adição de AG e ODQ na integridade de membrana plasmática das células do *cumulus*;
- Avaliar o efeito da adição de AG e ODQ nas concentrações de AMPc e GMPc nos complexos *cumulus*-oócito e oócitos;
- Determinar a influência do sistema iNOS/NO/GMPc na esteroidogênese das células foliculares.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 MATURAÇÃO OOCITÁRIA: NUCLEAR, CITOPLASMÁTICA E MOLECULAR

A maturação oocitária em mamíferos é um processo longo e complexo que está sujeito a diversos mecanismos que podem atuar inibindo ou estimulando este evento. O processo pelo qual o oócito completa a primeira divisão meiótica sofrendo alterações citoplasmáticas e progride para metáfase II é chamado maturação do oócito (TSAFRIRI e DEKEL, 2011; MEHLMANN, 2005).

Diversas são as alterações que ocorrem nos oócitos durante o processo de maturação e por este motivo os autores dividem este evento em três: maturação nuclear, maturação citoplasmática e maturação molecular. A maturação nuclear é caracterizada por modificações que ocorrem nos cromossomos durante as divisões meióticas, a citoplasmática compreende as alterações nas organelas celulares e durante a maturação molecular ocorrem as mudanças na síntese de mRNA e no padrão de proteínas (VORONINA e WESSEL, 2003).

##### 3.1.1 Maturação nuclear

O oócito inicia a primeira divisão meiótica durante sua vida fetal ou logo após o nascimento, porém ocorre uma interrupção mais conhecida como bloqueio da meiose durante a fase de diplóteno, a qual faz parte da prófase I meiótica. O oócito permanece nesta fase durante toda a infância do animal até períodos além da puberdade, onde posteriormente a cada ciclo reprodutivo da fêmea um grupo de oócitos reinicia a meiose (TSAFRIRI e DEKEL, 2011).

A meiose é o processo pelo qual as células germinativas diploides (oogônias ou espermatozoides) reduzem o número de cromossomos pela metade em preparação para a combinação com uma célula haploide do sexo oposto para criar um novo indivíduo (MEHLMANN, 2005). Este evento é composto por duas divisões celulares especializadas que ocorrem nas células germinativas. Cada uma das divisões é composta das mesmas fases: prófase, metáfase, anáfase e telófase,

porém a prófase II ocorre de maneira muito mais rápida do que a prófase I. O processo mais complexo ocorre na meiose I, durante a prófase, a qual é uma etapa muito longa, que pode ser dividida em leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e a diacinese (HYTTEL et al., 2012).

O oócito na fase de diplóteno é caracterizado pela presença de um grande núcleo conhecido como vesícula germinativa (VG) (TSAFRIRI e DEKEL, 2011). Os cromossomos na fase de VG são em sua maioria descondensados, dispersos e ativos transcricionalmente (VORONINA e WESSEL, 2003). Acredita-se que diversos fatores estão relacionados com o bloqueio meiótico, entretanto já foi esclarecido que a regulação da meiose é mediada pelos níveis de AMPc intraocitários (MEHLMANN, 2005).

Quando ocorre a retomada da meiose a transcrição cessa, os cromossomos se condensam e ocorre o rompimento da vesícula germinativa (RVG). Posteriormente os cromossomos homólogos se alinham e forma-se a placa metafásica na fase de metáfase I, depois ocorre a segregação dos cromossomos homólogos e a formação do primeiro corpúsculo polar, eventos que ainda fazem parte da primeira divisão. Para terminar o processo de maturação nuclear, inicia-se a meiose II, período em que ocorre a formação do segundo fuso, porém a meiose só se completa após a fertilização, sendo assim o oócito permanece na fase de metáfase até ser fertilizado (HOLT e JONES, 2009; VORONINA e WESSEL, 2003).

### **3.1.2 Maturação citoplasmática**

A maturação nuclear e citoplasmática são processos que ocorrem em sincronia, mas de forma independente. A maturação citoplasmática implica em mudanças bioquímicas e estruturais no citoplasma que dão origem a oócitos capazes de serem fertilizados e de desenvolverem embriões (YAMADA e ISAJI, 2011).

O processo de maturação oocitária é acompanhado por alterações fundamentais nas organelas celulares. Os oócitos possuem uma variedade de organelas típicas da maioria das células tais como aparelho de Golgi, mitocôndrias e retículo endoplasmático (RE), bem como também possuem organelas específicas como os grânulos corticais (GC). Algumas destas organelas apresentam mudanças drásticas que são marcas da progressão da meiose (VORONINA e WESSEL, 2003).

As mitocôndrias são responsáveis por gerar energia na forma de ATP, dentro do citoplasma dos oócitos. Uma maior atividade mitocondrial foi observada em oócitos de suínos desde a fase de VG até terminar a maturação (metáfase II) (BREVINI *et al.*, 2005). Em bovinos foi relatado que a morfologia de oócitos com baixos níveis de ATP piorou consideravelmente durante o período de maturação (STOJKOVIC *et al.*, 2001).

A reorganização de mitocôndrias ativas é necessária para vários eventos envolvidos na maturação citoplasmática (YAMADA e ISAJI, 2011). Em oócitos bovinos, as mitocôndrias ativas têm uma distribuição principalmente periférica no citoplasma durante a fase de VG, com o decorrer da maturação (MII) ocorre uma mudança nesta distribuição, uma vez que as mitocôndrias passam a se localizar de forma mais difusa (TARAZONA *et al.*, 2006).

Durante o processo de maturação do oócito, o RE passa por uma reorganização. Na fase de VG ocorre um acúmulo na região central do citoplasma e depois acontece durante a fase de MII um agrupamento na região cortical dos oócitos. A reorganização do RE é uma característica estrutural da maturação citoplasmática que permite que os oócitos adquiram a capacidade de serem fertilizados e de se desenvolverem (YAMADA e ISAJI, 2011).

Os grânulos corticais acumulados nos oócitos adquirem a capacidade de exocitose durante a maturação. Têm a função de segregar os conteúdos da fertilização e modificar a matriz extracelular do oócito para que esse não seja capaz de permitir a ligação e fusão de mais de um espermatozoide, evitando assim a polispermia (WESSEL *et al.*, 2001). Durante a maturação oocitária os grânulos corticais inicialmente são observados em grupos no citoplasma de oócitos, com a progressão da maturação ocorre uma migração para a periferia e finalmente quando o oócito atinge a MII os GC estão localizados no córtex (GOTTARDI e MINGOTI, 2009).

### **3.1.3 Maturação molecular**

A maturação molecular ocorre ao mesmo tempo em que a maturação citoplasmática e por este motivo alguns autores descrevem este evento como uma etapa da maturação citoplasmática (KRISHER, 2004; WATSON, 2007; BREVINI *et al.*, 2005).

Conforme o oócito cresce e amadurece, este adquire a capacidade de retomar e completar a meiose, posteriormente estará apto a passar pelo processo de fertilização e de iniciar e manter o desenvolvimento do embrião, no entanto para obter estas competências devem ocorrer alterações que incluem a síntese de proteínas e de mRNA para transcrição de DNA (KRISHER, 2004).

A síntese de proteínas é requerida durante a maturação do oócito em diversas espécies, como por exemplo, em camundongos (SCHULTZ, *et al.*, 1978) e em bovinos (SIRARD, *et al.*, 1989) . Acredita-se que as principais funções da síntese proteica durante a maturação sejam promover o desenvolvimento do oócito e o rompimento da vesícula germinativa (GVBD) (KRISHER, 2004; SIRARD, *et al.*, 1989).

Em um experimento realizado por Sirard *et al.* (1989) buscou-se avaliar a importância da síntese de proteínas para a maturação oocitária. Para este fim, foi utilizado um inibidor da síntese de proteínas no meio de cultivo de oócitos bovinos maturados *in vitro* e foi observado que na presença do inibidor menos de 10% dos oócitos apresentaram GVBD e nenhum oócito atingiu a metáfase I. Os autores observaram que até 3 horas de cultivo a síntese de proteínas é fundamental para que ocorra a condensação de cromatina, além do fato de que no grupo cultivado com o inibidor muitas anormalidades estruturais foram encontradas.

Durante a maturação os oócitos acumulam e armazenam uma grande quantidade de mRNA materno que será crítica para o desenvolvimento embrionário. A transcrição e armazenamento de mRNA materno ocorre durante o crescimento folicular, mas é interrompida quando ocorre a quebra da vesícula germinativa (GVBD) durante a meiose. O embrião é dependente do mRNA materno armazenado até a fase de zigoto que é quando começa a ocorrer a transcrição de genes embrionários (WATSON, 2007).

### 3.2 ÓXIDO NÍTRICO: ESTRUTURA, FUNÇÃO, SÍNTESE E INIBIÇÃO

O óxido nítrico (NO) é um mediador de sinalização com diversas atividades biológicas. A complexidade das respostas à atividade do NO reflete a variedade de suas reações químicas e propriedades biológicas. (IGNARRO, 2000; FUJII, IUCHI OKADA, 2005). Foi considerado por Morris e Billiar (1994) como o menor produto das células dos mamíferos, uma molécula simples de curta duração a qual medeia

funções muito diversas tais como, sinalização célula-célula e citotoxicidade mediada imunologicamente.

É uma molécula sem carga, composta por sete elétrons de nitrogênio e oito de oxigênio e um elétron desemparelhado. Acredita-se que o fato deste composto reagir rapidamente com uma seleta gama de moléculas se deva ao fato de possuir um elétron livre (BECKMAN e KOPPENOL, 1996).

De acordo com Ignarro (2000), a difusão é uma característica física importante do NO, que tem uma grande influência na determinação de sua concentração. O óxido nítrico é uma molécula pequena, solúvel em ambientes aquosos e hidrofóbicos e é altamente difusível. Por este motivo que em tecidos animais sua difusão através dos vasos sanguíneos ocorre rapidamente.

O óxido nítrico é útil como mensageiro intercelular, pois pode difundir-se através da maioria das células e tecidos com pouco consumo de energia, e sendo responsável adicionalmente por modular o fluxo sanguíneo, trombozes e atividade neural. A produção de óxido nítrico é também importante para o sistema de defesa, ajudando a destruir tumores e patógenos intracelulares (BECKMAN e KOPPENOL, 1996).

Os primeiros estudos a respeito da síntese, função e ação do óxido nítrico datam da década de 80 (DUSSE *et al.*, 2003), onde por meio de uma investigação a respeito do papel do endotélio vascular no processo de relaxamento do vaso sanguíneo descobriu-se que o NO representava a ação idêntica ao fator essencial para o relaxamento vascular, chamado endothelial-derived relaxing factor (EDRF), inclusive os dois possuem a mesma habilidade em elevar os níveis de GMPc no tecido vascular (MONCADA, PALMER e HIGGS, 1989).

Queiroz e Batista (1999) observaram que o NO pode funcionar com um neurotransmissor, porém, não se assemelha ou age como os outros neurotransmissores, uma vez que ele não é armazenado em vesículas e não apresenta mecanismos especiais de liberação, sendo produzido onde e quando necessário.

Apesar de existirem mecanismos alternativos para a geração de NO (acidificação ou redução de nitrito), na grande maioria dos mamíferos o NO é derivado de enzimas óxido nítrico sintase (NOS). Esta família de enzimas converte arginina em citrulina e NO na forma de  $\text{NADPH}^+$  e  $\text{O}_2$ -dependente (MONCADA, PALMER e HIGGS 1989; IGNARRO, 2000; DUSSE *et al.*, 2003). A atividade da

NOS depende da presença de oxigênio e outros cofatores, como a flavina mononucleótido (FMN), a flavina-adenina dinucleótido (FAD) e a nicotinamida-adenina nucleotídeo (NADPH), os quais vão se ligar ao terminal domínio redutase da NOS que possui sítios de ligação para esses fatores (ALDERTON *et al.*, 2001).

Existem três isoformas da NOS as quais fornecem uma ampla gama de perfis de concentração do óxido nítrico. Duas destas isoformas são constitutivas (neuronal - nNOS ou endotelial - eNOS), enquanto que a terceira é induzível (iNOS). Estas isoformas são diferencialmente reguladas em vários níveis, incluindo a transcrição, tradução e pós-tradução, bem como bioquimicamente. As duas principais diferenças entre estas isoformas envolvem a duração da geração de NO e da concentração local de NO que pode ser produzida (IGNARRO, 2000; MONCADA, PALMER e HIGGS 1991).

Segundo Ignarro (2000), a atividade enzimática da NOS é rigorosamente controlada e dependente da disponibilidade de substrato, bem como da taxa de transferência de elétrons. Embora todas as isoformas da NOS apresentem uma velocidade semelhante para a formação do óxido nítrico, existem diferenças na eficiência catalítica.

A distinção mais importante na regulação das atividades das isoformas de origem constitutiva e de origem induzível é o papel da calmodulina, tanto a eNOS quanto a nNOS são dependentes de cálcio. A síntese de NO pela iNOS, a qual é produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas, é limitada por substratos e cofatores que controlam sua atividade e outras vias do metabolismo dentro da célula (MORRIS e BILLIAR, 1994).

A iNOS não é expressa sob condições normais, é induzida por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células, incluindo macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condrócitos, neutrófilos, e plaquetas. Esta isoforma requer algumas horas para ser expressa, mas depois de sintetizada, libera quantidades maiores de NO do que as isoformas constitutivas. A produção do óxido nítrico por esta isoforma continua até que a L-arginina ou os cofatores necessários para sua síntese sejam esgotados ou ocorra a morte celular (DUSSE, 2003).

De acordo com Moncada, Palmer e Higgs (1991), a inibição das isoformas da NOS pode ser mediada por análogos da arginina N-substituídos, como a N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA), N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NA), N<sup>G</sup>-amino-L-arginina (L-NAA), N-imino-etil-L-ornitina (L-NIO) e N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME).

Esses análogos competem com a L-arginina e agem como inibidores estereoespecíficos da NOS. Estes inibidores têm grande importância na pesquisa dos prováveis efeitos do NO nos tecidos, já que a substituição da L-arginina pelos análogos irá inibir a produção do óxido nítrico e seus efeitos (FLORA FILHO e ZILBERSTEIN, 2000).

Outra substância comumente utilizada em estudos a respeito da fisiologia ovariana é a aminoguanidina (AG) que inibe seletivamente a produção de NO pela inibição da isoforma induzível da NOS. A aminoguanidina possui estrutura semelhante a L-arginina e atua competindo com a mesma inibindo assim a síntese de óxido nítrico e afetando o processo de maturação meiótica (MATTA et al., 2009; HUO et al., 2004).

### 3.3 ÓXIDO NÍTRICO NA MATURAÇÃO OOCITÁRIA

O óxido nítrico foi descrito por diversos autores como sendo um mediador importante nos processos intraovarianos (JABLONKA-SHARIFF e OLSON, 1998). Evidências suportam o envolvimento do NO na fisiologia ovariana e o aumento pré-ovulatório da atividade da NOS confirma a importância da produção do óxido nítrico para os processos fisiológicos ovarianos (YAMAUCHI *et al.*, 1997; FALETTI, *et al.*, 1999). A presença das três isoformas da NOS, endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS) foi detectada em uma variedade de tecidos reprodutivos de mamíferos, incluindo ovário, útero, testículos e epidídimo (SENGOKU *et al.*, 2001).

Em ratos foi comprovada a expressão da eNOS e iNOS e a participação do óxido nítrico no desenvolvimento folicular, na ovulação, na formação do corpo lúteo, no desenvolvimento embrionário, na pré-implantação e no início da implantação (JABLONKA-SHARIFF e OLSON, 1998; YAMAUCHI *et al.*, 1997; SENGOKU *et al.*, 2001). As isoformas da enzima NOS estão ativas nas células da granulosa de bovinos (ZAMBERLAM *et al.*, 2011), suínos (GRASSELLI *et al.*, 2001), em células do *cumulus* e oócitos murinos (JABLONKA-SHARIFF e OLSON, 2000).

Estudos anteriores relatam que a atividade da iNOS pode contribuir para a sobrevivência das células da granulosa. Em bovinos, o folículo dominante é composto por uma camada de células da granulosa em crescimento sob influência do mRNA, o qual acredita-se que esteja envolvido com a expressão da iNOS. De acordo com essas observações Zamberlam *et al.*, (2011) chegaram a conclusão de

que a participação do óxido nítrico no desenvolvimento de folículos bovinos pode variar, pois o grau de expressão da iNOS é dependente do estágio de crescimento do folículo.

Em roedores evidências suportam que o NO produzido pela iNOS atua estimulando a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) a produzir GMPc, o qual possui ação inibitória do metabolismo da PDE3A, mantendo altos níveis de AMPc dentro do oócito e atuando na parada meiótica (ABBASI *et al.*, 2008). O aumento pré-ovulatório de LH causa uma inibição da iNOS e conseqüentemente a ativação da PDE3A que diminui os níveis intraocitários de AMPc e o oócito retoma a meiose (NORRIS *et al.*, 2009).

De acordo com um experimento realizado por Jablonka-Shariff e Olson (2000), a inibição da síntese de NO por meio da utilização de L-NAME reduziu de maneira significativa a maturação meiótica de oócitos de camundongos. Resultados semelhantes foram obtidos em oócitos caprinos (AMALE *et al.*, 2013) e suínos (CHMELÍKOVÁ *et al.*, 2010).

Em experimentos realizados em bovinos os resultados da inibição da iNOS sugeriram que o NO endógeno produzido pela iNOS é necessário para a maturação nuclear espontânea dos oócitos (BILODEAU-GOELSSES, 2007), e/ ou para a transição de MI para MII (MATTA *et al.*, 2009; SCHUWARZ *et al.*, 2010).

A inibição da síntese de NO por meio da utilização de diferentes concentrações de Aminoguanidina ao meio de cultivo de complexos cumulus-oócito (COCs) bovinos causou um efeito inibitório sobre a expansão das células do *cumulus*, uma redução na integridade da membrana plasmática e inibição da maturação nuclear dos oócitos (MATTA, *et al.*, 2009).

Estudos a respeito da ação do óxido nítrico na maturação oocitária também podem ser realizados por meio da adição de nitroprussiato de sódio (SNP) ao meio de cultivo, visto que esta substância é doadora de NO. Em uma recente pesquisa utilizando oócitos de caprinos foi descoberto que a adição do SNP concomitante ao uso de L-NAME foi capaz de reverter os efeitos desse inibidor sobre a maturação oocitária (AMALE, SHAHNE e NASROLLAHI, 2013).

Porém, em um experimento realizado por Viana *et al.* (2007), foi descrito que os efeitos do SNP dependem da concentração utilizada, visto que em uma concentração mais alta foram constatados efeitos nocivos ligados ao fato de que altas concentrações de NO comprometeram a integridade da membrana plasmática,

das células do *cumulus* e do próprio oócito. No entanto, quando foram realizadas em concentrações mais baixas houve estimulação da maturação nuclear e citoplasmática.

### 3.4 NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS E FOSFODIESTERASES

A meiose dos oócitos de mamíferos é um processo longo e está sujeito a diversos mecanismos. É iniciada durante a vida fetal e fica bloqueada na fase de diplóteno durante a vida neonatal até a puberdade. Em fêmeas sexualmente maduras, durante cada ciclo reprodutivo, um grupo de oócitos tem o seu reinício retomado pelo aumento hormonal pré-ovulatório e avança até a fase de metáfase II. Os mecanismos envolvidos no controle da meiose ainda não foram totalmente explicados, porém existem evidências que suportam a participação do AMPc e GMPc, podendo atuar tanto estimulando quanto inibindo a maturação (BILODEAU-GOESEELS, 2007; TSAFRIRI e DEKEL, 2011).

O AMPc é produzido pela enzima adenilato ciclase que está localizada nas células da granulosa. Esta substância desempenha um papel crítico na manutenção do bloqueio meiótico, uma vez que altos níveis de AMPc evitam a maturação espontânea de oócitos cultivados *in vitro*, enquanto que um decréscimo em sua concentração está associado à retomada da meiose (CHEN et al., 2009). Sua concentração é mantida por uma fosfodiesterase chamada PDE3A, a qual é responsável por sua degradação (TSAFRIRI e DEKEL, 2011).

Atualmente existem dois modelos pelos quais se acredita que o AMPc mantenha o bloqueio meiótico, o primeiro diz respeito à transferência deste nucleotídeo através de junções comunicantes (Gap) continuamente para o oócito, onde o mesmo se liga à subunidade da proteína quinase A (PKA) e ocorre a fosforilação de proteínas que mantêm o oócito imaturo. Com o aumento pré-ovulatório de LH esta comunicação fica prejudicada e a concentração intraoocitária de AMPc diminui e ocorre a retomada da maturação (TSAFRIRI e DEKEL, 2011; CHEN et al., 2009).

Como alternativa, estudos mostram que o oócito pode gerar AMPc pela atividade constitutiva das proteínas Gs (MEHLMANN et al., 2002; KALINOWSKI et

al., 2004). E a inibição destas proteínas faz com que o reinício da meiose ocorra (MEHLMANN et al., 2004).

Desde que o AMPc foi identificado na membrana plasmática dos oócitos bovinos acredita-se que talvez a produção de AMPc pela adenilato ciclase mantenha a parada meiótica, muitos estudos indicam que esta molécula desempenha um papel importante no controle da meiose, no entanto uma vez que seu efeito é transitório e requer concentrações elevadas é possível que o AMPc atue em sinergia com outras vias de sinalização de forma eficiente para a inibição da maturação em bovinos (BILODEAU-GOELSES, 2011).

O GMPc atua como mensageiro secundário, é produzido pela estimulação do NO sobre a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) que catalisa a conversão de 5P guanosina-trifosfato (GTP) em guanosina cíclico 3P,5P guanosina-trifosfato (GMPc) que resulta na ativação de proteínas quinases GMPc-dependentes (DENNINGER e MARLETTA, 1999).

Com o objetivo de compreender outras vias de sinalização da parada meiótica foram realizados experimentos em camundongos onde foi constatado que oGMPc, produzido nas células da granulosa por meio da ativação da iNOS, se difunde através das junções comunicantes para o oócito. A estabilização do nível de GMPc nas células somáticas, é essencial para a manutenção do bloqueio da maturação (TSAFRIRI e DEKEL, 2011; NORRIS et al., 2009).

É possível dizer que o GMPc é responsável por controlar a concentração de AMPc dentro do oócito, uma vez que o GMPc pode estimular a hidrólise de AMPc, por meio da estimulação da atividade da PDE3A, reduzindo assim os níveis deste nucleotídeo (GRASSELLI *et al.*, 2001), ao mesmo tempo que quando ocorre a inativação da PDE3A, os níveis de AMPc aumentam e a retomada da maturação é interrompida (KURTZ, *et al.*, 1998).

A inibição da enzima GCs vem sendo realizada para estudar a função da via NO/GCc/GMPc, o inibidor específico dessa enzima, o 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) tem sido amplamente utilizado (ZHAO et al. 2000; BU et al., 2004; SELA-ABRAMOVICH et al., 2008; SCHWARZ, et al., 2013). Embora muitos estudos tenham sido realizados, o mecanismo de inibição detalhado da ação do ODQ sobre a GCs ainda não foi totalmente compreendido (ZHAO et al., 2000).

As fosfodiesterases (PDEs) são enzimas responsáveis pela catalisação da hidrólise dos nucleotídeos cíclicos, AMPc e GMPc. Existem PDEs que estão

relacionadas à degradação do GMPc (PDE 5, 6 e 9) e outras à do AMPc (PDE 3, 4, 7 e 8). Foram classificadas com base nas sequências de aminoácidos, propriedades bioquímicas, moleculares em 11 famílias (CONTI, et al., 2002).

O desenvolvimento de inibidores específicos contribuiu consideravelmente para a identificação e função das isoformas. Uma pesquisa a respeito das isoformas das fosfodiesterases presentes no folículo ovariano revelou que 80% das PDEs encontradas são do tipo PDE3 enquanto os outros 20% são do tipo PDE8 (SASSEVILLE et al., 2009).

Com o objetivo de avaliar os efeitos da inibição da atividade das PDEs em oócitos bovinos e de roedores foi utilizado um inibidor específico, o IBMX. Nos oócitos bovinos foi constatado que as PDEs e o AMPc estão envolvidos no controle da meiose, no entanto mesmo quando os níveis de AMPc estão altos e quando inibidores de PDEs são utilizados a meiose é retardada, não ocorre a inibição (Bilodeau Goelsses, 2011), ao contrário do que acontece em ratos, nos quais a inibição das PDEs bloqueia a RVG (WIERSMA et al., 1998), indicando que existem outros mecanismos inibitórios que agem em sinergia com o AMPc e que provavelmente são importantes para o controle da parada meiótica, entretanto esses mecanismos ainda não foram esclarecidos (BILODEAU GOELSSSES, 2011).

### 3.5 A FUNÇÃO DOS ESTEROIDES NA FISIOLOGIA REPRODUTIVA E NA MATURAÇÃO OOCITÁRIA

O processo reprodutivo dos mamíferos é regulado por uma complexa, e parcialmente entendida, cascata de atividades combinadas do sistema nervoso central, tecidos secretórios, tecidos alvo e vários hormônios. O sistema nervoso central (SNC) recebe informações do ambiente em que o animal se encontra e as envia para as gônadas via eixo Hipotálamo-Pituitária-Gonadal. Os dois primeiros, além de serem produtores de hormônios, são órgãos alvo, formando assim um sistema de feedback, por meio do qual regulam sua própria secreção (BARUSELI, 2007).

A partir de um estímulo do SNC os neurônios no hipotálamo produzem o Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH), o qual é transportado pelo sistema porta hipotálamo-hipofisário ao lobo anterior da pituitária, estimulando-a a secretar o

Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e o Hormônio Luteinizante (LH). O FSH atua estimulando o desenvolvimento dos folículos ovarianos e o LH tem ação nas células da teca interna estimulando a síntese de androstenediona a partir do colesterol. A androstenediona é convertida em testosterona que é aromatizada em estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) sob influência do FSH nas células da granulosa. Quando o estradiol ultrapassa certo nível, o hipotálamo responde com um pico de LH que inicia a ovulação. Após a ovulação, as células residuais do folículo são remodeladas, formando o corpo lúteo, sob influência do LH. O corpo lúteo é a estrutura responsável pela produção de progesterona (BARUSELI, 2007).

Os hormônios esteroides derivam do colesterol e possuem uma estrutura química semelhante à do próprio colesterol. Existem diferentes hormônios esteroides e vários locais de onde podem ser secretados, como por exemplo, o cortisol e aldosterona, produzidos pelo córtex suprarrenal e o E<sub>2</sub> e a P<sub>4</sub>, secretados pelo ovário e pela placenta (GUYTON, 2006). A principal função do E<sub>2</sub> durante o ciclo estral é a indução dos sintomas de estro e a P<sub>4</sub> é responsável pela manutenção da gestação, impedindo novas ovulações (BARUSELI, 2007).

Após o pico pré-ovulatório de LH e da quebra das junções comunicantes, o oócito é submetido a uma série de alterações que culminam no processo de maturação. A inibição da secreção de LH ou de seus receptores resulta na prevenção da maturação e falha na ovulação. Fisiologicamente, os folículos dominantes (pré-ovulatórios) respondem ao pico de LH com uma diminuição brusca na produção de esteroides, o qual permanece em baixas concentrações até a ovulação (DIELEMAN et al., 1983).

O papel da P<sub>4</sub> na maturação dos oócitos de mamíferos e seu impacto sobre a qualidade dos oócitos ainda não está definido. No entanto, diversas linhas de pesquisa colocam em evidência a importância da P<sub>4</sub> para a maturação. Diversos estudos que investigam os mecanismos moleculares envolvidos no controle do desenvolvimento folicular e na ovulação em mamíferos demonstraram a importância da progesterona na regulação do ciclo (PELUSO, 2006; FAIR e LONERGAN, 2012).

A progesterona pode afetar a qualidade do oócito através do seu efeito sobre o desenvolvimento do folículo dominante. Uma vez que a frequência de secreção de GnRH é regulada por concentrações de P<sub>4</sub> circulantes durante o ciclo estral, que por sua vez regula a frequência dos pulsos de LH e esta frequência é determinante para os folículos ovulatórios. Portanto, quando a concentração de P<sub>4</sub> é alta, a frequência

dos pulsos de LH é baixa e o folículo dominante sofre atresia. A alta frequência dos pulsos de LH ocorre quando os níveis de  $P_4$  diminuem após a luteólise, ocorre então uma estimulação ao crescimento do folículo dominante, o qual secreta mais estradiol e inibina e finalmente ocorre a ovulação (IRELAND, 2000).

Com o objetivo principal de analisar como a progesterona atua durante o processo de maturação, Aparicio *et al.*, (2011) descreveram pela primeira vez a existência de receptores genômicos e não-genômicos de  $P_4$ , os quais são expressos tanto antes como depois da maturação. Todavia, o momento da expressão destes receptores varia de acordo com o tempo de maturação e de acordo com o tipo de célula, pois alguns receptores tiveram sua expressão aumentada nas células do *cumulus*, enquanto outros tinham uma maior expressão no oócito (APARICIO *et al.*, 2011).

A expressão também foi alterada quando o meio de cultivo foi suplementado com FSH, LH e  $P_4$ , o que significou mais um indício da participação da  $P_4$  durante a maturação *in vitro*. Porém, apesar da variação nos níveis de expressão dos receptores, quando a  $P_4$  foi inibida não houve alteração nas taxas de maturação.

Apesar do papel da  $P_4$  na maturação de oócitos não ter sido elucidado, sabe-se que a adição de progesterona no meio de cultivo durante a maturação de oócitos bovinos reduz a porcentagem de formação de blastocistos (APARICIO *et al.*, 2011), um efeito que pode ser parcialmente revertido pela utilização de um antiprostágeno (RU486) (SILVA e KNIGHT, 2000). Contudo, a diminuição nos níveis do  $E_2$  e o aumento brusco de  $P_4$  no fluido folicular de folículos pré-ovulatórios no período entre o pico de LH e a ovulação coincide com a retomada da meiose e a maturação do oócito, o que sugere a participação de  $P_4$  neste processo (FAIR e LONERGAN, 2012).

### 3.6 A IMPORTÂNCIA DO FOLÍCULO PARA MATURAÇÃO COMPLETA DO OÓCITO

Ao longo do desenvolvimento do folículo, os oócitos passam por várias modificações estruturais e bioquímicas (CHAVES, 2010). Esses eventos iniciam-se com a formação do folículo primordial e se estendem até a ovulação, momento no qual o oócito está quase pronto para a fertilização. O desenvolvimento do oócito e do folículo ocorre de forma simultânea e gradual (HYTTEL *et al.*, 1997), uma vez que

o desenvolvimento do folículo e do oócito são eventos paralelos e relacionados (AGUILLAR et al., 2001).

No início, dentro do folículo primordial, o oócito está rodeado por uma única camada de células da granulosa achatadas, seu núcleo é cercado por poucas mitocôndrias, retículo endoplasmático liso (REL) e rugoso (RER) e por pequenos aparatos de Golgi. Com o desenvolvimento e crescimento tanto do folículo como do oócito, no estágio de folículo terciário ou pré-ovulatório (cerca de 3mm) o oócito encontra-se rodeado por células do *cumulus*, as células da granulosa se multiplicam e as células da teca se diferenciam, ocorrendo a formação de junções intercomunicantes entre o oócito e as células da granulosa. No citoplasma, ocorre o desenvolvimento do aparato de Golgi, o REL e as gotas lipídicas passam a se localizar periféricamente, além da formação da zona pelúcida e dos grânulos corticais (HYTTEL, et al., 1997; VAN WEELER e RODGERS, 1996).

Durante a fase de crescimento, os oócitos presos dentro de folículos aumentam consideravelmente de volume (SALHA, ABUSHEIKA e SHARMA, 1998), o que está relacionado com o acúmulo de uma grande quantidade de mRNA e proteínas que funcionam após a fertilização para apoiar e regular a pré-implantação embrionária. E por este motivo é que oócitos presos em pequenos folículos ainda não completaram a maturação citoplasmática e isso pode refletir em acúmulo deficiente de mRNA e proteínas (KRISHER, 2004).

De acordo com Krisher (2004), no momento do crescimento do oócito, dentro do folículo, muitos genes são expressos. Algumas dessas proteínas, tais como o fator promotor da maturação, estão envolvidas na progressão da meiose e controle do ciclo celular. Outros genes e suas respectivas proteínas podem estar envolvidos nos processos celulares críticos para o sucesso do desenvolvimento, antes e depois da ativação do zigoto.

O crescimento dos folículos concomitantemente com o desenvolvimento das várias camadas de células do oócito marca o estabelecimento de uma unidade fisiológica que responde a estímulos endógenos e exógenos de maneira coordenada (TSAFRIRI e DEKEL, 2011). Esta sincronia é obtida pela comunicação entre o oócito e as células de seu entorno, as células do *cumulus*, e é crítica para o desenvolvimento de um oócito competente no período de ovulação (KRISHER, 2004).

Antes e durante a onda de LH, o oócito é circundado por várias camadas de células do *cumulus*, as células da camada mais interna são as responsáveis por manter a comunicação com o folículo. Antes do pico de LH ocorre a quebra das junções Gap e o término da comunicação entre oócito e folículo. Ou seja, durante o período entre o pico da onda de LH e a ovulação, o oócito sofre alterações que culminam na maturação (RICHARDS et al., 2001).

Com o objetivo de esclarecer a importância do folículo para o desenvolvimento dos oócitos e sua ação inibitória sobre a maturação oocitária, diversos pesquisadores desenvolveram experimentos nos quais não só os oócitos foram cultivados *in vitro*, bem como as células foliculares (KOTSUJI, KUBO e TOMINAGA, 1994; RICHARD e SIRARD, 1996; TREMOLEDA et al., 2003; BARRETA et al., 2008; DUBEIBE-MARIN, 2013).

A partir de um sistema de cultivo *in vitro*, no qual dois tipos de células da parede folicular podiam ser cultivados junto com o complexo *cumulus*-oócitos (CCOs), o efeito da comunicação entre células da granulosa e da teca na maturação do oócito pôde ser investigado. Para isto os CCOs foram incubados com células da granulosa com ou sem as células da teca e o tempo da GVBD foi avaliado. Quando os oócitos foram cultivados apenas com as células da granulosa, 100% apresentaram quebra da vesícula após 6 horas. Porém, quando estes eram cultivados com células da granulosa e da teca o tempo para GVBD foi o dobro. Os pesquisadores concluíram que existia um sinal mediado a partir das células da teca, o qual é responsável por manter o bloqueio meiótico (KOTSUJI, KUBO e TOMINAGA, 1994).

Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Richard e Sirard (1996), que também realizaram o cultivo dos CCOs com cada tipo de célula (células da granulosa e da teca interna e externa) de maneira separada. Eles descobriram que as células da granulosa podem atuar na inibição, mas são as células da teca que produzem um fator inibitório.

Os autores testaram a atividade inibitória de um meio condicionado preparado por meio do cultivo de duas hemisseções de parede folicular em meio livre de soro por um período de 9 horas. Este meio condicionado manteve uma elevada porcentagem de oócitos na fase de VG, quando era adicionado a cada 4 horas de cultivo. Como conclusão, sugeriram que a manutenção do oócito na fase de VG é influenciada pelas células da teca, independente do contato e que os oócitos podem

ser mantidos em meio condicionado de hemisseções foliculares (RICHARD e SIRARD, 1996).

A utilização do cocultivo de CCOs bovinos com hemisseções foliculares já foi realizada para avaliação do efeito da via do sistema L-arg/NOS/NO sobre retomada e progressão da meiose (Figura 1). Objetivando mensurar a influência do aminoácido L-arginina (L-arg), precursor da síntese de óxido nítrico, realizou-se o cocultivo adicionando diferentes concentrações de L-arg, durante 22 horas de cultivo. A quantidade de oócitos mantidos em estágio de VG foi significativamente maior no controle com as HS do que quando comparado ao controle sem as hemisseções e os grupos suplementados com L-arg. Em relação à produção de esteroides, os grupos cultivados na presença das HS apresentaram uma maior concentração tanto de  $P_4$  quanto  $E_2$  (DUBEIBE-MARIN, 2013).

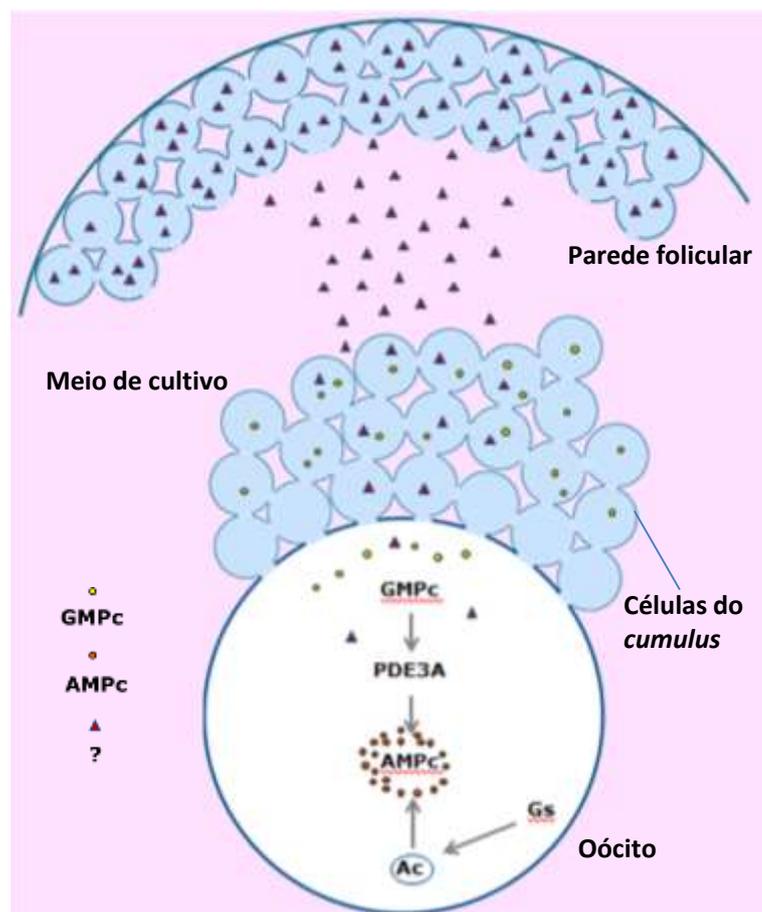


Figura 1. Esquema representativo da maturação in vitro de oócitos bovinos cocultivados em presença de hemisseções da parede folicular e o papel dos nucleotídeos cíclicos na maturação nuclear. Legenda: PDE3A – fosfodiesterase 3A, AC – enzima adenilato ciclase e Gs – proteínas Gs.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbasi M.; Akbari M.; Amidi F.; Ragerdi Kashani I.; Mahmoudi R.; Sobhani A.; Takzare N.; Pasbakhsh P.; Barbarestani M.; Abolhassani F.; Sato E. Nitric oxide acts through different signaling pathways in maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. **DARU**, vol. 17, p.48-52, 2009.

Aguilar, J.; Woods, G.; Mirageva, M. Olsen, I. Effect of homologous preovulatory follicular fluid on in vitro maturation of equine cumulus-oocyte complexes. **Theriogenology**, vol. 56, p.745-758, 2001.

Alderton, W. K., Cooper, C. E., Knowles, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemistry Journal*. vol. 357, p.593-615, 2001.

Amale, M.; Shahne, A.; Nasrollahi, S.; Effects of nitric oxide synthase inhibition on goat oocyte meiotic maturation. **Archiv Tierzucht**, n. 56 , 2013.

Aparicio, I.; Garcia-Herreros, M.; O'Shea, L.; Hensey, C.; Lonergan, P.; Fair, T. Expression, regulation, and function of progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, vol.84, p.910-921, 2011.

Barreta, M.; Oliveira, J.; Ferreira, R.; Antoniazzi, A.; Gasperin, B.; Sandri, L.; Gonçalves, P. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E<sub>2</sub> and F<sub>2a</sub>. **Reproduction**, vol. 136, p.733-740, 2008.

Baruseli, P. **Compêndio de Reprodução Animal**. Intervet. 2007.

Beckman, J.; Koppenol, W. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **The American Physiological Society**, p. 1424-1337, 1996.

Bilodeau-Goeseels, S. Effects of manipulating the nitric oxide\_cyclic GMP pathway on bovine meiotic resumption in vitro. **Theriogenology**, vol. 68, p.693-701, 2007.

Bilodeau-Goeseels, Sylvie.;Cows are not Mice: The Role of Cyclic AMP, Phosphodiesterases, and Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase in the Maintenance of Meiotic Arrest in Bovine Oocytes. **Molecular Reproduction e Development**, vol 78, p.734-743, 2011.

Brevini, T.; Vassena, R.; Francisci, C.; Gandolfi, F. Role of Adenosine Triphosphate, Active Mitochondria, and Microtubules in the Acquisition of Developmental Competence of Parthenogenetically Activated Pig Oocytes. **Biology of Reproduction**, vol. 72, p, 1218-1223, 2005.

Bu, Shumin; Xie, Huirong; Tao, Yong; Wang, Jianhong; Xia, Guoliang; 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**, vol. 223, p.85-93, 2004.

Chaves, R.; Duarte, M.; Matos, M.; Figueiredo, J. Sistemas de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, vol. 34, n.1, p.37-49, 2010.

Chen J.; Chi, M. M.; Moley, K. H.; Downs, S. M.cAMP pulsing of denuded mouse oocytes increases meiotic resumption via activation of AMP-activated protein kinase. **Society for Reproduction and Fertility**, vol. 138, p. 1741-7899, 2009.

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**, vol. 18, p.235-244, 2010.

Conti, M.; Mehats, C.; Andersen, C. B.; Filopanti, M.; Catherine Jin, S-L; Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling.**Trends in Endocrinology e Metabolism**, vol. 13, p.29-35, 2002.

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**, vol. 56, p.115-121, 1988.

Dekel, N.; Lawrence, T.; Gilula, N.; Beers, W.; Modulation of Cell-to-Cell Communication in the Cumulus-Oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. **Developmental Biology**, vol. 86, p.356-362, 1981.

Denninger, J. W.; Marletta, M. A.; Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1411, p. 334-350, 1999.

Dieleman, S.; Bevers, M.; Poortman, J.; Van Tol, H. Steroid and pituitary hormone concentrations in the fluid of preovulatory bovine follicles relative to the peak of LH in the peripheral blood. **Journal Reproduction and Fertility**, vol.69, p.641-649, 1983.

Dubeibe-Marin, D. **Efeito do Sistema L-arginina/ óxido nítrico na maturação in vitro de oócitos bovinos em presença de hemiseções de folículos ovarianos.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2013.

Dusse, L.; Vieira, L.; Carvalho, M. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e medicina laboratorial**, vol.39, n.4, p.343-350, 2003.

Fair, T.; Lonergan, P. The role of progesterone in oocyte acquisition of developmental competence. **Reproduction in Domestic Animals**, vol.4, p.142-147, 2012.

Faletti, A.; Martínez, S.; Perotti, C.; Gimeno, M. Activity of Ovarian Nitric Oxide Synthase (NOs) during Ovulatory Process in the Rat: Relationship with Prostaglandins (PGs) Production. **Nitric Oxide: Biology and chemistry**, vol.3, n.4, p.340-347, 1999.

Flora Filho, R.; Zilberstein, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Associação Medica Brasileira**, vol. 46, p.265-71, 2000.

Fujii, J; Iuchi, Y; Okada, F. Fundamental role of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive systems. **Reproductive Biology and Endocrinology**, vol.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**, vol.9, p.169-172, 2010.

Gottardi, F.; Migoti, G. Maturação de oócitos bovinos e influencia na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, vol.33, p.82-94, 2009.

Grasselli, F.; Ponderato, N.; Basini, G.; Tamanini, C. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide/cyclic GMP pathway in swine granulosa cells. **Domestic Animal Endocrinology**, vol. 20, p.241-252, 2001.

Guyton, A.; **Tratado de Fisiologia Médica**. 11º Edição. Rio de Janeiro, Elsevier, 2006.

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

Hou, Li-Jun; Liang, Cheng-Guang; Yu, Ling-Zhu; Zhong, Zhi-Sheng; Yang, Zeng-Ming; Fan, Heng-Yu; Chen, Da-Yuan and Sun, Qing-Yuan. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide regulates germinal vesicle breakdown and first polar body emission in the mouse oocyte. **Society for Reproduction and Fertility**, vol. 129, p. 403-409, 2005.

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

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

Hyttel, P.; Sinowatz, F. Vejlsted. **Embriologia Veterinária**. Elsevier Brasil, pp. 472, 2012.

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

Ireland, J.; Mihn, M.; Austin, E.; Diskin, M.; Roche, J. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. **Journal Dairy Science**, vol.83, p.1648-1658, 2000.

Jablonka-Shariff, A., Olson, L. M., Nitric oxide acts through different signaling pathways in maturation of murine cumulus-oocyte complexes in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, vol.55, p.412-421, 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**, vol. 139, p. 2944–54, 1998.

Kalinowski, R. R.; Berlot, C. H.; Jones, T. L. Z.; Ross, L. F.; Jaffe, L. A.; Mehlmann, L. M.; Maintenance of meiotic prophase arrest in vertebrate oocytes by a Gs protein-mediated pathway. **Developmental Biology**, v. 267, p. 1-13, 2004.

kotsuji, F.; Kubo, M.; Tominaga, T. Effect of interactions between granulosa and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, vol. 100, p.151-156, 1994.

Krisher, R. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, vol. 82, p.14-23, 2004.

Kurtz, A.; Gotz, K.; Hamann, M.; Wagner, C.; Stimulation of renin secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3. **Proceedings of the National Academy of Sciences**., vol. 95, p.4743-4747, 1998.

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**, vol.111, p.189–201, 2009.

Mehlmann, L. M.; Saeki, Y.; Tanaka, S.; Brennan, T. J.; Evsikov, A. V.; Pendola, F. L.; Knowles, B. B.; Eppig, J. J.; Jaffe, L. A. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. **Science**, vol. 306, p. 1947-1950, 2004.

Mehlmann, L. M.; Jones, T. L. Z.; Jaffe, L. A. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. **Science**, vol. 297, p. 1343-1345, 2002.

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

Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. **Biochemical Pharmacology**, vol.38, p.1709-1715, 1989.

Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A. Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacology Review**, vol, 43, p.109-142,1991.

Morris, S.; Billiar, T. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. **The American Physiological Society**, p.829-839, 1994.

Norris, R. P.; Ratzan, W. J.; Freudzon, M.; Mehlmann, L. M.; Krall, J.; Movsesian, M. A.; Wang, H.; Ke, H.; Nikolaev, V. O.; and Jaffe, L. A.; Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development**, vol.136, p.1869-1878, 2009.

Peluso, J.; Multiplicity of progesterone's actions and receptors in the mammalian ovary. **Biology of Reproduction**, vol. 75, p.2-8, 2006.

Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, vol.29, p.e45, 2001.

Queiroz, S.; Batista, A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Revista Química Nova**, vol, 22, p.584-590, 1999.

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

Richards, J. Perspective: The ovarian follicle – A perspective in 2001. **Endocrinology**, vol.142, p.2184-2192, 2001.

Salha, O.; Abusheika, N.; Sharma, V. Dynamics of human follicular growth and in-vitro oocyte maturation. **Human Reproduction Update**, vol.4, p.816-832, 1998.

Sela-Abramovich, S.; Galiani, D.; Nevo, N.; Dekel, N.; Inhibition of Rat Oocyte Maturation and Ovulation by Nitric Oxide:Mechanism of Action. **Biology of Reproduction**, vol. 78, p. 1111-1118, 2008.

Schultz, R.; LaMarca, M.; Wassarman, P. Absolute rates of protein synthesis during meiotic maturation of mammalian oocytes in vitro. **Biochemistry**, vol. 75, p. 4160-4164, 1978.

Sengoku, K.; Takuma, N.; Horikawa, M.; Tsuchiya, K.; Komori, H.; Sharifa, D.; Tamate, K.; Ishikawa, M.; Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth In vitro. **Molecular Reproduction and Development**, vol.58, p.262-268, 2001.

Sasseville, M.; Albus, F. K.; Côté, N.; Guillemette, C.; Gilchrist, R. B.; Richard, F. J. Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. **Biology of Reproduction**, vol. 81, p.415-425, 2009.

Silva, C.; Knight, P. Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, vol.119, p.261-269, 2000.

Sirard, M. Florman, H.; Leibfried-Rutledge, M.; Barnes, F.; Sims.; First, N.; Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, vol. 40, p.1257-1263, 1989.

Stojkovic, M.; Machado, S.; Stojkovic, P.; Zakhartchenko, V.; Hutzler, P.; Gonçalves, P.; Wolf, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, vol. 64, p. 904-909, 2001.

Tarazona, A.; Rodríguez, J.; Restrepo, L.; Olivera-Angel, M. Mitochondrial activity, Distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. **Reproduction Domestic Animal**, vol. 41, p. 5-11, 2006.

Tremoleda, J.; Tharasanit, T.; Van Tol, H.; Stout, A.; Colenbrander, B.; Bevers, M. Effects of follicular cells and FSH on the resumption of meiosis in equine oocytes matured in vitro. **Reproduction**, vol. 125, p.565-577, 2003.

Tsafriiri, A.; Dekel, N.; Intra- and intercellular molecular mechanisms in regulation of meiosis in murid rodents. **Oocyte maturation and fertilization: a long history for a short event**. Editora Bentham Books, p.38-63, 2011.

Tsafriiri, A.; Lindner, H.; Zor, U.; Lamprecht, S. In-vitro induction of meiotic division in follicle-enclosed rat oocytes by LH, cyclic AMP and prostaglandin E<sub>2</sub>. **Journal Reproduction Fertility**, vol. 31, p.39-50, 1972.

Van Wezel, I.; Rodgers, R. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. **Biology of Reproduction**, vol. 55, p.1003-1011, 1996.

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**, vol.102, p.217–227, 2007.

Voronina, E.; Wessel, G.; The regulation of oocyte maturation. **Current topics in developmental biology**, vol. 58, p. 53-110, 2003.

Watson, A. Oocyte cytoplasmic maturation: A key of oocyte and embryo developmental competence. **Journal of Animal Science**, vol. 82, 2007.

Wiersma, A.; Hirsch, B.; Tsafiriri, A.; Hanssen, R.G.J.M.; Van de Kant; Kloosterboer, H.J.; Conti, M.; Hsueh, A.J.W; Phosphodiesterase 3 Inhibitors Suppress Oocyte Maturation and Consequent Pregnancy without Affecting Ovulation and Cyclicity in Rodents. Vol, 102, vol. 3, p. 532-537, 1998.

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

Yamauchi, J.; Miyazaki, T.; Iwasaki, S.; Kishi, I.; Kuroshima, M.; Tei, C.; Yoshimura, Y. Effects of Nitric Oxide on Ovulation and ovarian Steroidogenesis and Prostaglandin production in the Rabbit. **Endocrinology**, vol. 138, p.3630-3637, 1997.

Zamberlam, G.; Portela, V.; Oliveira, J.; Gonçalves, P.; Price, C.; Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in bovine ovarian granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, vol. 335, p.189-194, 2011.

Zhao, Y.; Brandish, P.; DiValentin, M.; Schelvis, J.; Babcock, G.; Marletta, M.; Inhibition of soluble Guanylate Cyclase by ODQ. **Biochemistry**, vol.39, p.10848-10854, 2000.

## TRABALHO

O trabalho a seguir foi elaborado para futura publicação, seguindo as normas da revista Theriogenology.

### 1) PAPEL DA VIA iNOS/NO/GMPc NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

## PAPEL DA VIA iNOS/NO/GMPc NA MATURAÇÃO NUCLEAR *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

Torres<sup>1</sup>, N. F.; Caldas-Bussiere<sup>1</sup>, M. C.; Nogueira<sup>1</sup>, K. S.; Dubeibe<sup>1</sup>, D. F.; Paes de Carvalho<sup>1</sup>, C. S.; Dias<sup>1</sup>, A. J. B; Faes<sup>1</sup>, M.R.; Dias<sup>1</sup>, B. L; Souza<sup>2</sup>, C. L. M

<sup>1</sup>*Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias;* <sup>2</sup>*Laboratório de Engenharia Agrícola, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ, 28013-602, Brasil.*

Autor correspondente: Caldas-Bussiere, [mariaclaracaldasbussiere@gmail.com](mailto:mariaclaracaldasbussiere@gmail.com);

### RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o papel da via iNOS/NO/GMPc na maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Foram utilizados a aminoguanidina (AG), o inibidor seletivo da isoforma da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e o 1*H*-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-*a*] quinoxalin-1-one (ODQ), inibidor da guanilato ciclase solúvel (GCs) e 8 Bromo-guanosina 3'5'-monofosfato cíclico (8Br-GMPc, análogo do GMPc). CCOs foram cultivados com hemisseções (HS) da parede folicular em meio de maturação (TCM 199/BSA), suplementado com AG (1 e 100 mM) e ODQ (10<sup>-3</sup> M). Os controles consistiram de CCOs cultivados em presença (C-) ou ausência (C+) de HS. Foram avaliados após 22 horas de cultivo o estágio de maturação nuclear, a integridade da membrana plasmática das células do *cumulus*, a concentração de nitrato/nitrito (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e de progesterona (P<sub>4</sub>) e 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) no meio de cultivo. A mensuração das concentrações de GMPc e AMPc foi realizada às 0, 1, 3,

6 e 9h para os COCs e às 0, 3, 6 e 9h nos oócitos. A percentagem de oócitos que alcançaram a metáfase II (MII) no C- diminuiu ( $41,0\pm 4,0\%$ ) em relação ao grupo C+ ( $78,5\pm 3,9\%$ ) ( $P<0,05$ ). A adição de 1 mM de AG estimulou a retomada da meiose em relação ao C- ( $P<0,05$ ). A adição de ODQ promoveu o desbloqueio da retomada da meiose, entretanto, apresentou o menor número de oócitos que progrediram até a MII ( $21,9\pm 3,5$ ) ( $P<0,05$ ). A concentração de GMPc diminuiu ao longo das horas avaliadas em todos os grupos experimentais ( $P<0,05$ ). A concentração de AMPc nos COCs apresentou um aumento ao longo do tempo para todos os tratamentos ( $P<0,05$ ). Diferente do que é relatado em COCs de roedores, onde quando mensuradas as concentrações de GMPc e AMPc ocorre uma diminuição para que ocorra a retomada meiotica (NORRIS et al., 2009). Por este motivo, foi realizada a mensuração desse nucleotídeo somente nos oócitos, onde sua concentração foi decrescente ( $P<0,05$ ). O C+ apresentou a maior percentagem de células do *cumulus* com membrana plasmática íntegra ( $P<0,05$ ). A adição das HS ao cultivo (C-) aumentou a produção de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  ( $36,6\pm 3,1\text{ng/mL}$ ) em relação ao C+ ( $18,9\pm 1,4\text{ng/mL}$ ) ( $P<0,05$ ). A produção de  $\text{P}_4$  foi maior no C- e demais tratamentos ( $P<0,05$ ). Os resultados do presente experimento permitem concluir que em bovinos a via iNOS/NO/GMPc utilizando este modelo experimental: 1) modula a diminuição da concentração de GMPc no COC e AMPc no oócito para que ocorra a retomada da meiose e progressão até MII; 2) modula a integridade das células do *cumulus*; 3) não modula a síntese de  $\text{P}_4$  e  $\text{E}_2$  pelas células do *cumulus* e da parede folicular.

Palavras-chave: inibição da meiose, óxido nítrico, maturação in vitro, aminoguanidina, nucleotídeo.

## 1.0 INTRODUÇÃO

Durante a maturação nuclear os oócitos de mamíferos permanecem parados no estágio de prófase, pertencente à primeira meiose, mais precisamente na fase de diplóteno, até que ocorra o pico pré-ovulatório de LH levando à retomada da maturação e posterior ovulação (TSAFRIRI e DEKEL, 2011; MEHLMANN, 2005). Durante este estágio, o oócito permanece dentro do folículo ovariano, o qual se acredita possuir efeito inibitório na retomada da meiose, principalmente pela ação

das células da teca que inibem parcialmente a maturação quando adicionadas ao cultivo (RICHARD e SIRARD, 1996).

Por ser um processo extremamente complexo e por muitas vias enzimáticas estarem envolvidas em seu controle, a maturação oocitária ainda não é um evento completamente esclarecido. Entretanto, já foi demonstrado que os nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc) e o óxido nítrico (NO) possuem um papel importante na retomada e progressão da meiose até a fase de metáfase II (BILODEAU-GOESEELS, 2007; TSAFRIRI e DEKEL, 2011).

O AMPc é produzido pela enzima adenilato ciclase que está localizada tanto nas células da granulosa quanto dentro do oócito e desempenha um papel crítico na manutenção do bloqueio meiótico, uma vez que em alta concentração intraoocitária, mantém os oócitos em diplóteno, enquanto que um decréscimo em sua concentração está associado à retomada da meiose (CHEN et al., 2009). O GMPc atua como mensageiro secundário, podendo ser produzido pela estimulação do NO que ativa a enzima guanilatociclase solúvel (GCs) (DENNINGER e MARLETTA, 1999). A estabilização da alta concentração de GMPc nas células somáticas é essencial para a manutenção do bloqueio da maturação (NORRIS et al., 2009).

O NO é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) que possui três isoformas: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) (IGNARRO, 2000). No ovário de vacas já foram identificadas as isoformas eNOS e iNOS (PIRES et al., 2009) e em mamíferos, o NO participa dos processos de desenvolvimento folicular, ovulação (ZAMBERLAN et al., 2013), formação do corpo lúteo (JAROSZEWSKI, et al., 2014), desenvolvimento embrionário, pré-implantação e início da implantação (YAMAUCHI *et al.*, 1997).

Todavia, o envolvimento da via NOS/NO nos eventos que regulam a maturação oocitária em bovinos ainda não foi completamente elucidado, entretanto quando a iNOS (MATTA et al., 2009) e a eNOS (SCHWARZ et al., 2010) foram inibidas durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos na ausência da parede folicular houve o bloqueio da progressão da meiose até a fase de metáfase II (MII), demonstrando a importância dessa via para a maturação nuclear.

Adicionalmente, sabe-se que o NO influencia o processo de síntese de hormônios esteroides pelas células da granulosa bovinas (FAES et al., 2009). A participação dos hormônios esteroides é fundamental para o desenvolvimento e a competência folicular (BARUSELI, 2007) e o papel da progesterona ( $P_4$ ) e  $17\beta$ -

estradiol ( $E_2$ ) já foi evidenciado na maturação oocitária (PELUSO, 2006; FAIR e LONERGAN, 2012). Estes dados sugerem que o NO poderia modular a maturação oocitária também por meio de sua ação na síntese de esteroides (FAES et al., 2009).

O objetivo do presente trabalho foi compreender o papel do NO derivado da enzima iNOS nos eventos que ocorrem durante a maturação oocitária *in vitro* de bovinos, pelo estudo da atuação da via iNOS/NO/GMPc, tentando simular o que ocorre *in vivo* por meio do cocultivo dos oócitos com hemisseções de paredes foliculares.

## **2.0 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Meios e reagentes**

Todos os reagentes utilizados foram da Sigma-Aldrich Co. LLC. (EUA), exceto os mencionados.

### **2.2 Coleta dos ovários e preparação das hemisseções da parede folicular**

Os ovários foram obtidos de abatedouros locais imediatamente após o abate e transportados em solução salina com antibióticos (100 UI/mL penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina). No laboratório, com o auxílio de pinças cirúrgicas e tesouras estéreis, foi realizada a dissecação dos folículos de 3 a 8 mm retirando todo o estroma ovariano. Depois de dissecados, os folículos foram cortados ao meio com uma lâmina de bisturi e lavados em meio de cultivo de tecidos 199 (TCM 199 – HEPES) acrescido de 0.4% de albumina sérica bovina (BSA) isenta de ácidos graxos, 0,2 mM de piruvato, 100 UI/mL de penicilina G potássica, 50 µg/mL de sulfato de estreptomicina. As HS foram transferidas para placas de 4 poços (NUNC®, Rochester, NY, 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 (Lutropin-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 CO<sub>2</sub>.

### 2.3 Punção oocitária e maturação *in vitro*

Folículos de 3-8 mm foram aspirados usando seringa de 5mL e agulha calibre 18 “G” (1,20 x 40 mm) e os CCOs coletados imediatamente foram colocados em meio de lavagem [meio TCM 199 sem HEPES suplementado com 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, 0,5 mM)] para mantê-los no estágio de vesícula germinativa (EPPIG e DOWNS, 1984). O IBMX é um inibidor reversível da meiose e vem sendo utilizado para inibir a retomada espontânea da maturação em oócitos bovinos durante a obtenção e manipulação dos CCOs *in vitro* (VIANA, et al., 2007). Somente os CCOs que apresentaram mais de três camadas de células do *cumulus* e ooplasma homogêneo foram selecionados e então lavados rapidamente no meio de lavagem para remoção do IBMX. Posteriormente, os CCOs foram transferidos para as placas que já continham as oito HS das paredes foliculares. O período entre aspiração e seleção até os CCOs serem colocados na placa de MIV não ultrapassou 30 min. O cultivo foi realizado durante 22 h em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, 38°C e umidade saturada.

### 2.4 Determinação do estágio de maturação nuclear

Os oócitos foram desnudados por meio de pipetagens repetidas em solução contendo PBS com 0.1% de PVA. Posteriormente, foram colocados entre lâmina e lamínula e fixados em solução etanol-ácido acético (3:1) (Merck S.A. Indústrias, Rio de Janeiro, Brasil), durante um período mínimo de 24 h e por fim, foram corados comorceína acética 2%. A avaliação do estágio de maturação nuclear de cada oócito foi feita com auxílio de microscópio invertido (400x, NIKON - Eclipse TE 300, Melville, Japan). Os oócitos foram classificados dependendo do estágio de maturação nuclear em: vesícula germinativa (VG), rompimento da vesícula germinativa (RVG), metáfase I (MI), anáfase/telófase I (A/T) e metáfase II (MII).

### 2.5 Mensuração da concentração dos nucleotídeos cíclicos

A avaliação da concentração intracelular de AMPc e GMPc foi realizada por meio da técnica de imunoensaio enzimático (EIA), utilizando-se *kits* comerciais (Cayman's cGMP e cAMP EIA *kits*, Ann Arbor, EUA). Os CCOs/oócitos foram

cuidadosamente selecionados para que apresentassem o mesmo número de camadas das células do *cumulus*, com o objetivo de manter o padrão da análise. Depois do cultivo, os CCOs/oócitos foram lavados em meio TCM-199 suplementado com 0,4% de BSA. Para induzir a lise celular os CCOs/oócitos foram transferidos para uma solução de 0,1M de HCl (200 µL), onde foram mantidos por 20 min e agitados em vortex por 1 min a cada 5 min. As amostras foram centrifugadas a 12,000 x g por 5 min e o sobrenadante estocado a -20° C até que as avaliações fossem realizadas de acordo com as instruções dos respectivos *kits*. Todas as amostras foram acetiladas para aumentar a sensibilidade da análise, de acordo com o recomendado no manual dos *kits*. A concentração de nucleotídeos foi determinada utilizando um espectrofotômetro (leitor de ELISA, BioTek, Winooski, VT, USA) a 405nm.

## **2.6 Avaliação da integridade da membrana plasmática das células do *cumulus***

Após o desnudamento dos oócitos, as membranas plasmáticas das células do *cumulus* foram avaliadas por meio de marcação dupla utilizando sondas fluorescentes. O hoechst 33342 tem afinidade pelo DNA das células emitindo coloração azul após sua ligação e o iodeto de propídeo (IP) marca as células com membrana lesada (coloração vermelha). As células foram expostas por 5 min a cada um dos corantes e posteriormente foram colocadas entre lâmina e lamínula, e analisadas em microscópio de epifluorescência (400x, NIKON - Eclipse TE300/TE200, Melville, Japão) (técnica realizada por VIANA et al., 2011). Os resultados foram expressos em percentagem de células com a membrana íntegra ou lesada.

## **2.7 Mensuração da concentração de nitrato/nitrito**

A concentração de nitrato/nitrito ( $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ ), metabólitos estáveis do NO, tem sido utilizada como indicador da presença de NO no meio de cultivo, visto que este apresenta meia-vida muito curta (IGNARRO, 2000). A mensuração foi realizada pelo método baseado na reação colorimétrica de Griess (RICART-JANÉ et al. 2002). Para o desenvolvimento da técnica as amostras foram centrifugadas (2700 x g por 5 min), estocadas (100 µL) e mantidas a -20° C até a mensuração. Para conversão de

$\text{NO}_3^-$  em  $\text{NO}_2^-$ , as amostras foram incubadas em placas de 96 poços com uma solução de redução (10 IU da enzima  $\text{NO}_3^-$  redutase diluída em água ultrapura + 900  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, 1000  $\mu\text{L}$  do cofator NADPH (5 mg/mL) diluído em água ultrapura, 1000  $\mu\text{L}$  da solução tampão de fosfato de potássio (0.5 M)] a 37° C por 16 h. Foi realizada a diluição da curva padrão de  $\text{NaNO}_3$  em meio de cultivo TCM 199, variando de 0,5 a 100  $\mu\text{M}$ . A leitura foi feita em espectrofotômetro (leitor de ELISA, Boitek®, Winooski, EUA) a 540 nm. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M/L}$ .

## 2.8 Mensuração da concentração de hormônios esteroides

O meio de cultivo utilizado durante as 22 horas de MIV foi centrifugado (2700 x g por 5 minutos) e o sobrenadante foi armazenado em freezer a -20° C até que fossem realizadas as mensurações de progesterona ( $\text{P}_4$ ) e 17 $\beta$ -estradiol ( $\text{E}_2$ ). A concentração hormonal foi determinada pela utilização do método de quimioluminescência (Listed Laboratory Equipment 7 C20 UL®, MH 15423, série 3975, DPC Immulite I) e pela utilização de kits comerciais (Immulite® 1000 Systems, Siemens Healthcare Diagnostics Products Ltd, Glyn Rhonwy, Llbamberis, Gwynedd LL55 4 EL, UK). O método é baseado em um imunoenensaio competitivo de fase sólida que utilizou enzimas com tecnologia quimioluminescente com o limite de detecção entre 15-20 ng/mL (FAES et al., 2009).

## 2.9 Experimentos

Foram avaliados os efeitos da adição de aminoguanidina (AG, inibidor seletivo da isoforma da enzima iNOS), 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ - inibidor da enzima guanilatociclase solúvel) e 8 Bromo-Guanosina 3'5'-monofosfato cíclico (8Br-GMPc, análogo do GMPc) na maturação *in vitro* de oócitos bovinos cocultivados na presença de hemisseções da parede folicular sobre diferentes parâmetros. Para cada uma das avaliações foram cultivados dois grupos controle, um na ausência das HS (C+) e o outro em presença das HS foliculares (C-).

### 2.9.1 Experimento 1: *Efeito de AG, ODQ e 8Br-GMPc na maturação nuclear*

Grupos de 20 oócitos tratados com AG (1, 10, 50, 100 e 150 mM), ODQ ( $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-3}$ M) e 8Br-GMPc (2,5; 5,0; 7,5 e 10 mM) e seus grupos controles (C+ e C-) foram submetidos à coloração com orceína acética 0,2% para avaliação do efeito dose-resposta na retomada e progressão da meiose por meio da determinação do estágio de maturação nuclear, após 22 de cultivo. Para cada substância testada foram realizadas 6 repetições, totalizando 2160 oócitos (AG=840 oócitos, ODQ=600 oócitos e 8-Br-GMPc=720 oócitos).

### 2.9.2 Experimento 2: Efeito da AG na cinética de maturação nuclear

Grupos de 20 oócitos tratados com AG (1 e 100 mM) e ODQ ( $10^{-3}$  M) e seus controles (C+ e C-) foram maturados durante 7, 15 e 22 horas e posteriormente foram submetidos à coloração com orceína acética 0,2% para avaliação do efeito dessa substância ao longo do processo de maturação *in vitro*. Em cada horário avaliado foram realizadas 6 repetições, totalizando 1440 oócitos.

### 2.9.3 Experimento 3: *Efeito da inibição da iNOS e da guanilato ciclase solúvel na concentração de nucleotídeos*

Oócitos tratados com AG (1 e 100 mM) e ODQ ( $10^{-3}$  M) e cocultivados com HS da parede folicular foram submetidos à avaliação da concentração de GMPc e AMPc nos CCOs e de AMPc no oócito por meio da técnica de imunensaio enzimático (EIA). Grupos de 30 e 10 CCOs foram utilizados para mensuração da concentração de GMPc e AMPc, respectivamente (Bilodeau-Goeseels, 2007), enquanto que para a determinação da concentração de AMPc no oócito, foram utilizados 50 para cada repetição. Foram realizadas 4 repetições por nucleotídeo e por cada tempo de maturação (0, 1, 3, 6 e 9h - CCOs e 0, 3, 6 e 9h – oócitos), totalizando 8000 CCOs/oócitos (GMPc= 3000 CCOs, AMPc= 1000 CCOs e AMPc= 4000 oócitos). Os resultados da mensuração da concentração de GMPc foram expressos em pmol/mL e os de AMPc em fmol/mL.

#### 2.9.4 Experimento 4: *Efeito da adição de AG e ODQ na integridade da membrana plasmática das células do cumulus*

Oócitos tratados com AG (1 e 100 mM) e ODQ ( $10^{-3}$  M) após 22 horas de cocultivo com HS da parede folicular foram desnudados e as células do *cumulus* submetidas à marcação fluorescente com hoesch/iodeto de propídio para avaliação da integridade da membrana plasmática. Foram realizadas seis repetições e para cada tratamento de cada repetição foram contabilizadas 200 células do *cumulus*, totalizando 6000 células avaliadas.

#### 2.9.5 Experimento 5: *Efeito da adição de AG e ODQ na concentração de nitrato/nitrito*

O meio de cultivo de oócitos tratados com AG (1 e 100 mM) e ODQ ( $10^{-3}$  M) após 22 horas de cocultivo com HS da parede folicular foi submetido à avaliação da concentração de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  pelo método da reação colorimétrica de Griess, como indicativo da presença de óxido nítrico.

#### 2.9.6 Experimento 6: *Efeito da adição de AG e ODQ na produção de $P_4$ e $E_2$*

O meio de cultivo de oócitos tratados com AG (1 e 100 mM) e ODQ ( $10^{-3}$  M) após 22 horas de cocultivo com HS da parede folicular foi submetido à mensuração da concentração de progesterona e  $17\beta$ -estradiol realizada utilizando o método automatizado de quimioluminescência.

### 2.10. Análise estatística

Todos os oócitos foram distribuídos ao acaso dentro de cada grupo experimental e cada experimento foi repetido seis (maturação nuclear e integridade da membrana plasmática das células do *cumulus*) ou quatro vezes (mensuração hormonal, de nucleotídeos e de nitrato/nitrito). Os dados foram avaliados usando o SAEG (Fundação Arthur Bernardes-UFV-Viçosa, Brasil) pela análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, em 5% de probabilidade.

### 3.0 RESULTADOS

#### 3.1 Efeito do sistema iNOS/NO/GMPc na maturação nuclear

Ao avaliar o efeito da inibição das enzimas iNOS (AG) e GCs (ODQ) e da adição do análogo do GMPc (8Br-GMPc) sobre a maturação nuclear, foi possível observar que os grupos controle utilizados tanto na presença (C-) e ausência (C+) das HS apresentaram resultados similares. Nos três experimentos o controle cultivado na presença das hemisseções (C-) inibiu a retomada e progressão da meiose até a MII quando comparado ao C+ ( $P < 0,05$ ).

##### 3.1.2 Efeito da aminoguanidina

A porcentagem de oócitos mantidos em VG foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo controle cultivado com HS (C-) quando comparada aos grupos tratados com AG (1, 10, 50 e 100 mM), exceto na concentração de 150 mM de AG ( $P > 0,05$ ). A adição de 1 e 10 mM de AG estimulou a retomada da meiose em relação ao C- ( $P < 0,05$ ) e foram iguais ao C+ ( $P > 0,05$ ). Contudo, a adição de 100 e 150 mM de AG inibiu a retomada da meiose e bloqueou a progressão até a MII em relação aos demais tratamentos com AG e controles ( $P < 0,05$ ) (Tabela 1).

##### 3.1.3 Efeito do ODQ

A adição de ODQ estimulou a retomada da meiose, porém na concentração de  $10^{-3}$  M houve uma diminuição no número de CCOs que alcançaram a MII ( $21,9 \pm 3,5$ ) em relação ao C+ ( $78,6 \pm 16,6$ ) e C- ( $39,1 \pm 1,7$ ) e aos demais tratamentos ( $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  M) ( $33,0 \pm 1,81$ ;  $35,7 \pm 2,5$ , respectivamente) ( $P < 0,05$ ) (Tabela 2).

##### 3.1.4 Efeito do 8Br-GMPc

Quando foram analisadas as concentrações utilizadas de 8Br-GMPc (2,5; 5,0; 7,5 e 10 mM) na maturação *in vitro* de CCOs bovinos foi possível observar que não houve diferença em relação ao C- ( $P > 0,05$ ) (Tabela 3).

### 3.1.5 Determinação das concentrações utilizadas AG e ODQ

Nos experimentos seguintes foram adicionadas ao meio de cultivo 1 mM de AG que estimulou a retomada da meiose em relação ao C- e 100 mM que bloqueou a progressão da meiose até MII. A concentração mais alta de ODQ avaliada anteriormente ( $10^{-3}$ M) foi selecionada para realização dos próximos experimentos, pois quando adicionada ao meio de cultivo estimulou a retomada da meiose, porém diminuiu o número de CCOs que alcançaram MII. Visto que não houve efeito do 8Br-GMPc na maturação nuclear, o mesmo tratamento não foi utilizado nos demais experimentos.

### 3.2 Efeito da inibição da iNOS na cinética de maturação nuclear

Ao avaliar o efeito da adição de AG (1 e 100 mM) durante 7 horas de MIV foi possível observar que no controle na ausência das HS foliculares (C+) 52,9% dos oócitos romperam a vesícula germinativa (RVG) enquanto no C- (presença de HS) apenas 24,7% dos oócitos cultivados nesse grupo retomaram a meiose. Esse resultado não foi diferente do obtido no cultivo com 1 mM de AG no qual 27,3% dos oócitos romperam a VG. Após a adição de 100 mM de AG no meio de cultivo houve uma inibição da retomada da meiose, onde apenas 11,4% dos oócitos apresentaram RVG (Figura 1 a).

Com 15 horas de cultivo, 100% dos oócitos cultivados no grupo C+ alcançaram a metáfase I (MI), enquanto que na presença das HS (C-) apenas 66,9% dos oócitos atingiram esse estágio de maturação. Após a adição de 1 mM de AG ao meio de cultivo houve uma diminuição na percentagem de oócitos que progrediram até MI (51,3%) e essa diminuição foi mais acentuada com a utilização de uma concentração mais alta de AG (100 mM), onde apenas 33,8% atingiram a MI (Figura 1 b).

Às 22h de MIV no controle na ausência de HS (C+), 20,4% dos oócitos estavam em anáfase-telófase, enquanto que os outros 79,6% alcançaram a MII. Contudo, no C- não havia oócitos em A-T e 40,3% deles estavam em MII. Não houve diferença entre o C- e o grupo tratado com 1 mM de AG (45,1%) na percentagem de oócitos que progrediram até MII ( $P>0,05$ ), mas, a adição de 1 mM de AG aumentou a percentagem de oócitos em A-T comparado ao C- ( $P<0,05$ ).

Após a adição de 100 mM de AG, houve a completa inibição da progressão da meiose até esse estágio ( $P < 0,05$ ; Figura 1 c), mas não alterou a porcentagem de oócitos em A-T quando comparado ao grupo tratado com 1 mM de AG ( $P > 0,05$ ).

### **3.3 Efeito do sistema iNOS/NO/GMPc na concentração de nucleotídeos**

#### *3.3.1 Efeito da adição de AG e ODQ na concentração de GMPc no COC*

Foi testado o efeito da adição de AG (1 e 100 mM) e ODQ ( $10^{-3}$  M) na produção de GMPc de CCOs nas primeiras 9 horas de MIV (0, 1, 3, 6 e 9 horas) (Figura 3).

Quando comparada com a concentração de GMPc dos COCs imaturos (0 hora de cultivo), a concentração de GMPc dos COCs de todos os tratamentos e grupos controle diminuiu ao longo das horas avaliadas ( $P < 0,05$ ). O grupo C+ manteve a concentração de GMPc mais alta em todas as avaliações ( $P < 0,05$ ).

Com 1 hora de cultivo o grupo tratado com 100 mM de AG apresentou a menor concentração de GMPc quando comparado aos demais tratamentos ( $P < 0,05$ ). Às 3 horas de cultivo esse grupo permaneceu com a concentração mais baixa ( $P < 0,05$ ) e no grupo tratado com ODQ a concentração de GMPc apresentou uma queda acentuada quando comparada com as duas avaliações anteriores (às 0 e 1 hora de MIV) ( $P < 0,05$ ). A concentração do grupo tratado com ODQ foi a mais baixa quando comparada aos demais tratamentos durante as avaliações com 6 e 9 horas ( $P < 0,05$ ).

#### *3.3.2 Efeito da adição de AG e ODQ na concentração de AMPc no COC*

Adicionalmente, foi testado o efeito da adição de AG (1 e 100 mM) e ODQ ( $10^{-3}$  M) na produção de AMPc pelo CCOs nas primeiras 9 horas de MIV (0, 1, 3, 6 e 9 horas) (Figura 2).

Comparando-se a concentração de AMPc dos CCOs imaturos (0 hora de cultivo) com a concentração de AMPc nas horas seguintes foi possível observar que houve um aumento em todos os tratamentos ( $P < 0,05$ ). A partir de 1 hora de cultivo o grupo tratado com ODQ apresentou a concentração mais alta em relação aos demais tratamentos e se manteve assim até a última avaliação (9 horas de MIV)

( $P < 0,05$ ). Os CCOs tratados com 100 mM de AG apresentaram a menor concentração de AMPc durante as 6 horas do cultivo ( $P < 0,05$ ).

### 3.3.2 Efeito da adição de AG e ODQ na concentração de AMPc no oócito

Foi testado o efeito da adição de AG (1 e 100 mM) e ODQ ( $10^{-3}$  M) na produção de AMPc pelos oócitos nas primeiras 9 horas de MIV (0, 3, 6 e 9 horas) (Figura 5). A produção de AMPc somente pelos oócitos foi consideravelmente menor quando comparou-se com a concentração desse nucleotídeo no CCO. A produção de AMPc nos CCOs foi crescente e o contrário foi observado nos oócitos.

Foi observado uma diminuição da concentração de AMPc nos oócitos de todos os tratamentos ( $P < 0,05$ ), exceto com 100 mM de AG que se manteve inalterada ( $P > 0,05$ ) com 3h de cultivo quando comparada à concentração observada em oócitos imaturos (0 horas). Analisando os grupos controle, foi possível observar que os oócitos cultivados na presença das HS (C-) apresentaram uma concentração maior de AMPc do que a observada no C+ com 9 horas de cultivo ( $P < 0,05$ ).

### 3.4 Efeito do sistema iNOS/NO/GMPc na integridade da membrana plasmática das células do *cumulus*

A integridade da membrana plasmática das células do *cumulus* do grupo de oócitos cultivado sem as HS (C+) ( $85,9 \pm 2,3\%$ ) foi maior do que a observada no grupo C- ( $71,2 \pm 3,7\%$ ) e dos demais tratamentos com 1 e 100 mM de AG, ( $57,8 \pm 12,1\%$ ;  $55,3 \pm 4,3\%$ , respectivamente) ( $P < 0,05$ ). A adição de  $10^{-3}$  M de ODQ apresentou o menor número de células íntegras ( $49,7 \pm 6,8\%$ ) em relação a todos os tratamentos com ODQ e grupos controle ( $P < 0,05$ ) (Tabela 4).

### 3.5 Efeito do sistema NO/iNOS/GMPc na concentração de nitrato/nitrito no meio de cultivo

O controle cultivado com as hemisseções da parede folicular (C-) apresentou uma concentração de nitrito total maior ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo C+ e demais tratamentos. O grupo tratado com 1 mM de AG apresentou uma concentração menor de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  ( $31,42 \pm 1,67$ ) do que o grupo C- ( $36,63 \pm 3,15$ ) ( $P < 0,05$ ).

Entretanto, o tratamento com 100 mM de AG não diferiu estatisticamente do C- (36,59±1,09; 36,63±3,15, respectivamente) (P>0,05). O tratamento com 10<sup>-3</sup> M de ODQ resultou na maior produção de nitrato/nitrito total (P<0,05) (Tabela 5).

### 3.6 Efeito do sistema iNOS/NO/GMPc na produção de hormônios esteroides

A presença da parede no meio de cultivo (C-) aumentou a concentração de progesterona em relação ao controle C+ (P<0,05) (Figura 6). O C+ (11,8±1,1 ng/mL) e os tratamentos com 1 mM (6,9±3,3 ng/mL) e 100 mM de AG (7,2±1,6 ng/mL) e 10<sup>-3</sup> M de ODQ (11,0±3,3 ng/mL) não diferiram entre si (P>0,05).

A concentração de E<sub>2</sub> no meio de cultivo não diferiu entre o C+ (208,7±17,43 ng/mL) e o C- (247,7±14,0 ng/mL), assim como não houve diferença entre o C- e os demais tratamentos com 100 mM de AG (210,7±13,53 ng/mL) e 10<sup>-3</sup>M de ODQ (214,7±22,9 ng/mL) não diferiram entre si (P<0,05). O grupo tratado com 1 mM de AG apresentou a maior concentração (258,2±29,93 ng/mL) (P<0,05).

## 4.0 DISCUSSÃO

Já foi evidenciado que os oócitos de mamíferos permanecem em diplóteno (imaturos) enquanto estão localizados dentro dos folículos ovarianos (TSAFRIRI e DEKEL, 2011). A utilização do cultivo dos CCOs em presença das hemisseções da parede folicular teve por objetivo simular *in vitro* o que ocorre *in vivo*, assim como compreender os eventos que ocorrem durante a maturação oocitária e a influência da via iNOS/NO/GMPc nesse evento.

Giometti et al. (2005) e Dubeibe et al. (2013) demonstraram que a presença das HS bloqueia parcialmente o reinício e a progressão da maturação. Isto pode ser justificado pelo fato das células foliculares modularem a maturação oocitária por meio da produção de vários fatores inibidores e estimuladores da meiose (RICHARD e SIRARD, 1996). Estes dados sugerem que as células da parede folicular (teca e granulosa) sintetizam substâncias que inibem parcialmente a retomada da meiose (RICHARD e SIRARD, 1996), sendo estas transportadas para o oócito por outras vias diferentes das junções intercomunicantes entre células da granulosa murais e células do *cumulus*, afetando a maturação do oócito, porém sem estimular a

expansão das células do *cumulus* como observado no presente experimento (dados não mostrados).

A adição de AG avaliada com 22h de cultivo apresentou um efeito-dose resposta onde as concentrações mais baixas (1 e 10 mM) foram capazes de estimular a retomada da meiose em comparação ao C-, mas não aumentaram a percentagem de oócitos em MII. Concentrações mais elevadas (50, 100 e 150 mM) aumentaram progressivamente o bloqueio da retomada da meiose e progressão até MII. Estes dados mostram que em bovinos é necessária uma diminuição da concentração de NO derivado da iNOS para que ocorra a retomada da meiose, entretanto, quando esta diminuição da atividade da iNOS foi mais acentuada após a adição de 100 e 150 mM de AG, ocorreu o bloqueio total da progressão até MII, sugerindo que uma menor concentração de NO derivado da iNOS é importante para a manutenção do oócito em diplóteno e progressão da meiose até MII. Sua elevação é importante para a retomada e progressão da meiose até MII dependendo da sua concentração. Mais estudos são necessários para comprovar esta hipótese em bovinos.

A síntese de GMPc é realizada pela enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) (DENNINGER e MARLETTA, 1999) e a inibição dessa enzima pode ser realizada pela utilização de ODQ. O GMPc é produzido nas células foliculares e é continuamente transferido para o oócito via junções intercomunicantes (WEBB et al., 2002). Esse nucleotídeo tem fundamental importância para maturação oocitária em ratos (BU et al., 2004), suínos (PETR et al., 2006) e bovinos (BILODEAU-GOESELS, 2011; DUBEIBE et al., 2013; SCHWARZ et al., 2014).

Ao analisar o efeito da adição de diferentes concentrações de ODQ no meio de cultivo em presença das HS da parede folicular foi possível observar que oócitos tratados com de  $10^{-3}$ M de ODQ apresentaram uma diminuição no número de oócitos que progrediram até a MII quando comparado com os controles e demais tratamentos. Estes dados mostram que a diminuição na disponibilidade de GMPc diminui a percentagem de oócitos que retomam a meiose e progressão até MII, sugerindo sua participação na manutenção da parada meiótica por meio da inibição da enzima guanilato ciclase solúvel.

Com o objetivo de compreender melhor o papel da via iNOS/NO/GMPc na maturação nuclear também foram testadas diferentes concentrações (2,5; 5,0; 7,5 e 10 mM) de 8-Br-GMPc (análogo do GMPc) na maturação nuclear. Foi possível

observar que nenhuma concentração adicionada ao meio de cultivo apresentou efeito na maturação nuclear de CCOs bovinos na presença de hemisseções da parede folicular. Estes resultados corroboram com os encontrados por Bilodeau-Goeseels (2007) que utilizou concentrações semelhantes de 8-Br-GMPc (0,5; 1; 3 e 6 mM) na MIV de oócitos de bovinos cultivados em gotas de meio às 7 e 21h. Contudo, Schwarz et al (2014) observaram inibição da retomada da meiose com 9 h de cultivo. Estas diferenças nos resultados podem ser devido a sistemas de cultivo e tempos de cultivo diferentes.

No presente estudo, foi avaliado o efeito de duas concentrações de AG (1 e 100 mM) ao longo da maturação *in vitro* em sistema de cultivo com a presença de HS da parede folicular. Às 7h de MIV é esperado que os oócitos tenham rompido a vesícula germinativa (RVG) (VIANA et al., 2007), todavia, foi observado que tanto a presença das HS isoladamente (C-), quanto a adição de AG inibiram o RVG em relação ao C+. Bilodeau-Goeseels (2007) demonstrou que a presença de 10 e 50 mM de AG nas 7 primeiras horas de MIV reduziu significativamente a percentagem de oócitos bovinos que retomaram a meiose, assim como no presente trabalho. Esses resultados indicam que a AG exerce um efeito inibitório na retomada da meiose nessa espécie, diferindo do que é observado em roedores onde a adição de AG ao meio estimula a retomada da meiose (PANDLEY & CHAUBE, 2014).

Com 15 horas de cultivo é relatado que a maioria dos oócitos atinge a anáfase-telófase (A-T) (WEHREND e MEINECKE, 2001). A presença das HS (C-) diminuiu o número de oócitos que atingiram a A-T em relação ao C+. A adição de 1 e 100 mM de AG bloqueou a progressão da maturação até esse estágio, indicando mais uma vez o efeito inibitório da AG na progressão da meiose.

Às 22 horas de cultivo em condições favoráveis, os CCOs normalmente atingem a MII, assim como ocorreu na maioria dos CCOs cultivados no grupo C+ (78,5±3,9%). No grupo C-, apenas 41,0±4,0% dos CCOs alcançaram esse estágio. A adição da 1 mM de AG estimulou a progressão até a MII dos oócitos, destes, 44,7±3,2% estavam em MII, entretanto, quando foi adicionado 100 mM de AG, nenhum oócito foi observado neste estágio. Esses resultados podem ser explicados pelo fato da AG inibir a síntese de NO e essa substância é necessária em quantidades específicas para a maturação dos oócitos. Em ratas já foi demonstrado que concentrações mais baixas de NO são necessárias para a retomada da meiose (TRIPATHI et al., 2009), o que pode justificar o efeito benéfico da concentração mais

baixa de AG na progressão da meiose, todavia, em bovinos uma diminuição na concentração de NO prejudica a maturação nuclear, como mostrado por Matta et al. (2009) utilizando a mesma concentração de AG (100 mM).

Após o pico pré-ovulatório do LH, ocorre aumento da concentração do fator de crescimento semelhante ao EGF (MEHLMANN, 2005), que induz à ativação da MAPK que é responsável pela fosforilação da conexina 43, levando ao fechamento das junções comunicantes (ABRAMOVICH et al., 2005; NORRIS et al., 2009). Huo et al. (2005) demonstraram que após a adição da AG no meio de maturação de oócitos de ratas houve a inibição do rompimento da vesícula germinativa e da extrusão do primeiro corpúsculo polar. Adicionalmente, foi observado que houve a fosforilação da MAPK, tornando essa enzima inativa. Outro fator importante na retomada da meiose é o fator promotor da maturação (MPF), o qual é ativado um pouco antes da retomada meiótica e é necessário para o rompimento da vesícula germinativa (EPPIG et al., 2004). Sua atividade aumenta até que atinja um platô no final da primeira fase M meiótica (MI) (BRUNET e MARO, 2005). Pandey e Chaube (2014) demonstraram em roedores que a redução da concentração intraocitária de NO pela inibição da iNOS pode induzir a retomada da meiose em oócitos alterando a concentração do GMPc e/ou da concentração da forma ativa da proteína Cdc25B requerida para ativação do MPF. Assim, é possível que a AG em bovinos possa modular a retomada e progressão da meiose alterando a atividade do MPF e MAPK. Mais estudos são necessários para se comprovar esta hipótese.

Os mecanismos e fatores envolvidos na parada e na retomada meiótica ainda não são totalmente compreendidos, entretanto, a função dos nucleotídeos cíclicos nesses processos vem sendo continuamente estudada. Em ratos já foi estabelecido que o efeito estimulador dos hormônios envolvidos na maturação (LH, FSH, hCG, PGE<sub>2</sub>) é mediado pelo AMPc (BILODEAU-GOESEELS, 2011) e evidências sugerem que é necessário alta concentração intraocitária de AMPc e GMPc para manutenção da parada meiótica em roedores (NORRIS et al., 2009).

Ao avaliar os resultados da mensuração da concentração do GMPc foi possível observar que para todos os grupos controle e tratamentos utilizados houve uma diminuição ao longo das horas avaliadas, entretanto o grupo tratado com OQD, apresentou as menores concentrações a partir das 6 horas (P<0,05). Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Bilodeau-Goeseels (2007), que avaliou a concentração de GMPc utilizando grupos tratados com ODQ (10<sup>-5</sup> e 10<sup>-4</sup> M)

e observou que as concentrações de GMPc foram significativamente mais baixas às 3 horas de cultivo quando comparadas ao grupo controle.

Schwarz et al. (2014) também encontraram resultados semelhantes quando mensuraram a concentração de GMPc durante as primeiras horas da MIV (0, 1, 3 e 6h) e avaliaram os efeitos da presença de um doador de NO (SNAP) e da sua associação com o ODQ. Foi observada uma diminuição ao longo das horas avaliadas em todos os tratamentos e grupo controle. Contudo, a presença do ODQ manteve a concentração de GMPc mais baixa desde a primeira hora até o fim das avaliações. Esses resultados são semelhantes aos observados no presente experimento, demonstrando a ação do ODQ na atividade da enzima guanilato cilcase solúvel por meio da diminuição da concentração de GMPc no CCO.

Quando a concentração de AMPc foi mensurada nos CCOs (0, 1, 3, 6 e 9 horas) foi possível observar que houve aumento gradativo desde a primeira hora até às 9h de cultivo. Este fato pode ser explicado pela presença de FSH no meio de cultivo utilizado, afetando a concentração intracelular de AMPc durante as primeiras horas de MIV.

Diferente dos resultados do presente experimento, Bilodeau-Goeseels (2007) e Schwarz et al. (2014) observaram que a concentração de AMPc no CCO apresentou uma diminuição ao longo das horas avaliadas, porém após a adição de SNAP no meio de cultivo não alterou a concentração de AMPc no CCO, demonstrando que o NO não afeta a retomada da meiose via AMPc nas condições estudadas.

O que poderia justificar os resultados encontrados em nosso grupo de pesquisa são as condições de cultivo diferentes dos demais trabalhos, onde o cultivo dos CCOs (grupos de 20 CCOs/tratamento) foi realizado em placa de quatro poços contendo HS da parede folicular (C+) em 200 µL de meio de cultivo contendo 0,4 % de BSA. No trabalho realizado por Schwarz et al. (2014), a MIV foi realizada em gotas (100µL) de meio contendo recobertas por óleo mineral. Assim, uma maior proporção entre oócito/meio (µL) (1/10 x 1/4) no presente experimento pode ter favorecido à síntese de AMPc pelas células do *cumulus*.

Outra possibilidade seria que o aumento crescente do AMPc nos CCOs durante as 9 horas de MIV, provavelmente seria devido ao fato de que a integridade de membrana das células do *cumulus* foi mantida após 22 horas de cultivo em placa mantendo uma proporção alta de oócito/meio (µL) (VIANNA et al., 2011). Em CCOs cultivados em gotas ao final de 22h o meio está acidificado (mudança de coloração)

lesando a membrana das células do *cumulus* (VIANA et al., 2011). Estes dados sugerem que a qualidade das células do *cumulus* podem estar interferindo na concentração de AMPc contido nestas células ou CCOs.

A alta concentração oocitária de AMPc vem sendo relatada como um dos principais fatores relacionados à parada meiótica. (EPPIG et al., 2004; SHIMADA et al., 2013). Estudos anteriores sugeriram que elevadas concentrações de AMPc nas células do *cumulus* de CCOs bovinos podem influenciar a maturação nuclear mesmo se os oócitos desses CCOs apresentarem alta concentração de AMPc (BILODEAU-GOESEELS et al., 1993). Anos mais tarde, o mesmo grupo de pesquisa foi o pioneiro ao demonstrar em bovinos que as concentrações de AMPc no CCO são aumentadas em resposta a um inibidor da PDE3A, entretanto, a concentração do GMPc não foi mensurada no oócito, todavia foi sugerido que a maior parte do aumento na concentração de AMPc no CCO se deve a um aumento desse nucleotídeo nas células do *cumulus* (BILODEAU-GOESEELS, 2003).

Não foram encontrados trabalhos em bovinos onde foram realizadas as mensurações de AMPc tanto nos CCOs quanto nos oócitos isoladamente. Como os resultados do presente trabalho indicavam que o aumento da concentração de AMPc nos CCOs ao longo das 9 h de cultivo poderia ser justificado por um aumento desse nucleotídeo nas células do *cumulus*, também foi realizada a mensuração de AMPc nos oócitos. Foi possível verificar que ocorre uma diminuição ao longo das horas avaliadas (0, 3, 6 e 9h) nos controles e em todos os tratamentos.

Quando comparados esses resultados da mensuração de AMPc nos oócitos com os resultados obtidos na avaliação da maturação nuclear onde foram realizados os mesmos tratamentos, é possível estabelecer uma relação, pois o tratamento que apresentou a maior percentagem de oócitos que progrediram até MII foi o C+, o mesmo que apresentou as menores concentrações de AMPc no oócito. Assim como o tratamento com ODQ ( $10^{-3}$  M) foi o que bloqueou a progressão da meiose e apresentou as maiores concentrações de AMPc intraoocitária, pode sugerir que assim como em ratos, em bovinos ocorre uma diminuição da concentração de AMPc dentro do oócito para que os mesmos possam retomar à meiose. Diferente do que foi observado por Schwarz et al. (2014), a concentração de AMPc no oócito de bovinos foi modulada pela via iNOS/NO/GMPc neste modelo utilizado no presente experimento.

De acordo com os resultados encontrados na mensuração da concentração de nucleotídeos no presente trabalho, sugerimos que o sistema de cultivo utilizado permite que as células do *cumulus* continuem a sintetizar o AMPc, contudo o mesmo não ocorre com o GMPc, sugerindo que a origem do GMPc seja somente das células da granulosa e não do *cumulus*.

Ao avaliar a integridade de membrana das células do *cumulus* foi possível observar que a presença das HS reduziu o número de células viáveis. Adicionalmente, foi observado um efeito dose-resposta tanto com a utilização de AG como de ODQ, onde a adição de concentrações mais elevadas dessas substâncias (100 mM de AG ou  $10^{-3}$  M de ODQ) no meio de cultivo promoveu a diminuição da integridade das células do *cumulus*.

Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Matta et al. (2009), que avaliaram a adição de 10 e 100 mM de AG ao meio de cultivo de CCOs bovinos e observaram que nos dois tratamentos houve uma diminuição da porcentagem de células do *cumulus* íntegras em relação ao grupo controle, sugerindo que a diminuição da disponibilidade de NO (inibição da iNOS pela AG) pode influenciar na integridade das células do *cumulus*, assim como pode estar ligada com a retomada e progressão da meiose.

O ODQ atua inibindo a ativação da enzima GCs, não ocorrendo assim, a utilização do NO como catalisador da conversão do GMPc para a forma ativa. Acredita que a não utilização do NO pela GCs pode ter levado a um aumento da concentração do mesmo no meio de maturação, o que pode ter diminuído a progressão da maturação como o observado em bovinos (VIANA et al., 2007) e ratos (PANDEY e CHAUBE, 2014). Outra hipótese seria que o aumento na concentração de NO no meio de cultivo pode ter causado danos a membrana plasmática das células do *cumulus*, uma vez que em alta concentração, o óxido nítrico pode ser citotóxico (FAES et al., 2009; VIANA et al., 2011) e causar estresse oxidativo (DUBEY et al., 2011).

O papel do óxido nítrico durante a retomada da meiose nas várias espécies de mamíferos e nos diferentes tipos de cultivo é controverso (PANDEY e CHAUBE, 2014). Em camundongos (HUO et al., 2005; Pandey et al., 2010) e suínos (CHMELÍKOVÁ et al., 2010) foi demonstrado que a diminuição da concentração de NO (inibição da iNOS) induz à retomada da meiose. Por outro lado, em bovinos, a adição de inibidores da NOS no meio de cultivo inibe a retomada da meiose, assim

como a adição de doadores de NO pode inibir ou estimular a retomada da meiose nessa espécie, dependendo da concentração utilizada. (BILODEAU-GOESEELS, 2007; SCHWARZ et al., 2014). Já em ratos, a utilização de inibidores da NOS suprime a formação do corpúsculo polar e o uso de doadores de NO reverte o efeito causado pelo uso de inibidores da NOS (BU et al., 2002; TORNELL et al., 1990), o que não ocorreu em bovinos (Bilodeau-Goeseels, 2007).

Verificou-se que o C- aumentou a concentração de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  em relação ao C+. A adição de 1 mM de AG diminuiu a concentração de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ , enquanto a utilização de ODQ aumentou a concentração de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ . No trabalho realizado por Matta et al. (2009), a concentração de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  no meio de cultivo onde foi adicionado 1 e 10 mM de AG não diferiu do controle, todavia a adição de 100 mM de AG aumentou a concentração de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ . Apesar das condições de cultivo serem diferentes, acredita que a hipótese de existir um mecanismo de produção de NO compensatório pelas demais isoformas da NOS seja válida, pois mesmo com a inibição da iNOS não houve a diminuição na produção de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ . Em relação à adição de ODQ os resultados diferiram dos encontrados por Faes et al. (2009), onde a concentração de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  no meio de cultivo não apresentou diferença entre o grupo controle e o cultivado na presença de  $10^{-4}$  M de ODQ. Mais estudos são necessários para avaliar a ocorrência do controle da concentração de NO no meio de cultivo por meio do “feedback” entre as isoformas da enzima óxido nítrico sintase.

As células da granulosa e da teca presentes na parede folicular possuem a função de promover um ambiente adequado para que o folículo desenvolva sua principal atividade que é a biossíntese de  $\text{P}_4$  e  $\text{E}_2$  regulada por gonadotrofinas e outros fatores que modulam sua atividade. Adicionalmente, o NO vem sendo mencionado como um regulador da esteroidogênese (BASINI et al., 1998; FAES et al., 2009).

No presente experimento, a presença da parede no meio de cultivo (C-) promoveu um aumento de 30 vezes na concentração de  $\text{P}_4$  em relação ao C+, fato que pode ser justificado provavelmente pelo maior número de células esteroidogênicas e precursores da síntese de  $\text{P}_4$  no interior das células. Os demais tratamentos (C-, 1 e 100 mM de AG e  $10^{-3}$  M de ODQ) não diferiram entre si.

Em relação à concentração de  $\text{E}_2$ , somente o grupo tratado com 1 mM de AG apresentou uma concentração maior de  $\text{E}_2$  quando comparado ao C+, contudo não foi diferente do C-. A adição de 100 mM de AG e  $10^{-3}$  de ODQ não diferiu entre si e

em relação ao C-. Esses dados sugerem que o oócito modula a concentração de E<sub>2</sub>, provavelmente via junções intercomunicantes entre as células do *cumulus* e as células da granulosa muralis como ocorre no folículo antral *in vivo* (MEHLMAN et al., 2012). Na ausência desta via de comunicação, só as células do *cumulus* estariam produzindo E<sub>2</sub> como no C+. A adição de 1 mM de AG aumentou a concentração de E<sub>2</sub> no meio de cultivo, provavelmente agindo nas células do *cumulus*. Mais estudos são necessários para comprovar esta hipótese.

Resultados diferentes foram encontrados por Faes et al. (2009), que observaram uma inibição da síntese de P<sub>4</sub> e uma estimulação da síntese de E<sub>2</sub> quando 10<sup>-3</sup> M de ODQ foi adicionado ao meio. Entretanto, nesse experimento somente células da granulosa foram cultivadas em placas durante 24 horas. As diferenças encontradas nos trabalhos podem ser explicadas pelo fato de que no presente experimento um número maior de células foi adicionado ao cultivo (HS) e por esse motivo os tratamentos podem não ter apresentado efeito em todas as células.

Os resultados do presente experimento permitem concluir que em bovinos a via iNOS/NO/GMPc utilizando este modelo experimental: 1) modula a diminuição da concentração de GMPc no CCO e AMPc no oócito para que ocorra a retomada da meiose e progressão até MII; 2) modula a integridade das células do *cumulus*; 3) não modula a síntese de P<sub>4</sub> e E<sub>2</sub> pelas células do *cumulus* e da parede folicular.

**Agradecimentos:** A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro (E-26/101.453/2011) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo.

**Contribuições dos Autores:** Natália Ferreira Torres conduziu o experimento com apoio de Karina Silva Nogueira e Diego Fernando Dubeibe. Angelo José Burla Dias contribuiu com sugestões para o desenvolvimento do trabalho. Carla Sobrinho Paes de Carvalho, Márcia Resende Faes e Bruna Lomba Dias auxiliaram no desenvolvimento das técnicas laboratoriais. Os dados foram analisados pelo Prof. Cláudio Luiz Melo de Souza. Maria Clara Caldas-Bussiere é a professora orientadora.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Basini G, Baratta M, Ponderato N, Bussolati S, Tamanini C. Is nitric oxide na autocrine modulator of bovine granulosa cell function? *Reproduction Fertility and Development*: 10, p.471-478, 1998.

Bilodeau-Goeseels, S. Effects of manipulating the nitric oxide\_cyclic GMP pathway on bovine meiotic resumption in vitro. *Theriogenology*: 68, p.693-701, 2007.

Bilodeau-Goeseels, S; Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. *Theriogenology*: 60, p.1679-1690, 2003.

Bilodeau-Goeseels, S.; Cows are not Mice: The role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. *Molecular Reproduction e Development*: 78, p.734-743, 2011.

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

Botigelli, R. C.; Schwarz, K. R.;Zaffalon, F. G.; Leal, C. L. Influence of nitric oxide and phosphodiesterase inhibitors on cyclic nucleotides and meiosis resumption in bovine oocytes in vitro matured. *Reproduction Fertility and Development*: 27, p.228, 2014.

Bu, S.M.; Xia, G.L.; Xie, H.R.; Guo, Y. Nitric oxide derived from cumulus cells promotes the meiotic resumption in mouse. *Chin. Sci. Bull*: 47, p.1730–1733, 2002.

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

Bu, S; Xie, H; Tao, Y; Wang, J; Xia, G. 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*: 223, p.85-93, 2004.

Chen J.; Chi, M. M.; Moley, K. H.; Downs, S. M.; cAMP pulsing of denuded mouse oocytes increases meiotic resumption via activation of AMP-activated protein kinase. *Society for Reproduction and Fertility*: 138, p. 1741-7899, 2009

Chmelíková, E.; Jeseta, M.; Sedmíková, M.; Petr, J.; Tumová, L.; Kott, T.; Lipovová, P.; Jílek, F.; Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. *Zygote*: 18, p.235-244, 2010.

Denninger, J. W.; Marletta, M. A.; Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*: 1411, p. 334-350, 1999.

Dubeibe-Marin, D. Efeito do Sistema L-arginina/ óxido nítrico na maturação in vitro de oócitos bovinos em presença de hemiseções de folículos ovarianos. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2013.

Dubey, P. K.; Influence of nitric oxide on in vitro growth, survival, steroidogenesis, and apoptosis of follicle stimulating hormone stimulated buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles. *Journal of Veterinarian Science*:3, p.257-65, 2011.

Eppig, J.J; Viveiros, M. M.; Marin-Bivens C, De La Fuente R. Regulation of mammalian oocyte maturation. In: Leung PCK, Adashi EY, editors. *The Ovary*. 2. Elsevier/Academic Press; San Diego, pp. 113–129, 2004.

Faes, M.R.; Caldas-Bussiere M.C.; Viana K. S.; Dias, B. L.; Costa, F. R.; Escocard, R. M.; Nitric oxide regulates steroid synthesis by bovine antral granulosa cells in a chemically defined medium. *Animal Reproduction Science*110: p.222-36, 2009.

Fissore, R.A.; HE, C.L.; Woude, G.F.V. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiotic resumption in bovine oocytes. *Biology of Reproduction*: 55, p.1261-1270, 1996.

Hou, Li-Jun; Liang, Cheng-Guang; Yu, Ling-Zhu; Zhong, Zhi-Sheng; Yang, Zeng-Ming; Fan, Heng-Yu; Chen, Da-Yuan and Sun, Qing-Yuan. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide regulates germinal vesicle breakdown and first polar body emission in the mouse oocyte. *Society for Reproduction and Fertility*: 129, p. 403-409, 2005.

Hubbard, C. J.; Terranova, P. F. Inhibitory action of cyclic guanosine 5'-phosphoric acid (GMPc) on oocyte maturation: Dependence on na intact cumulus. *Biology of Reproduction*: 26, p.628-632, 1982.

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

Jablonka-Shariff, A., Olson, L. M., Nitric oxide acts through different signaling pathways in maturation of Murine cumulus-oocyte complexes in vitro. *Rev Molecular Reproduction and Development*: 55, p.412-421, 2000.

Jablonka-Shariff, A.; Ravi, S.; Beltsos, A. N; Murphy, L. L; Olson, L. M; Abnormal estrous cyclicity after ddisruptionof endothelial and inducible nitric oxide synthase in mice. *Biology of Reproduction*: 61, p.171-177, 1999.

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*: 139, p. 2944-2954, 1998.

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*: 111, p.189-201, 2009.

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

Norris, R. P.; Ratzan, W. J.; Freudzon, M.; Mehlmann, L. M.; Krall, J.; Movsesian, M. A.; Wang, H.; Ke, H.; Nikolaev, V. O.; Jaffe, L. A. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*: 136, p.1869-1878, 2009.

Pandey, A. N.; Chaube, S. K.; Reduction of nitric oxide level leads to spontaneous resumption of meiosis in diplotene-arrested rat oocytes cultured in vitro. *Experimental Biology and Medicine* p.1-11, 2014.

Petr, J.; Rajmon, R.; Chmelíková, E.; Tománek, M.; Lánská, V.; Pribánová, M.; Jílek, F. Nitric-oxide-dependent activation of pig oocytes: the role of the cGMP-signalling pathway. *Zygote*: 14 p.9-16, 2006.

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

Schwarz, K. R. L.; Pires, P. R. L.; Mesquita, L. G.; Chiaratti M. R.; Leal, C. L. V.; Effect of nitric oxide on the cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway during meiosis resumption in bovine oocytes. *Theriogenology*: 81, p. 556-564, 2014.

Schwarz, K. R.; Pires, P. R.; de Bem, T. H.; Adona, P. R.; Leal, C. L. Consequences of nitric oxide synthase inhibition during bovine oocyte maturation on meiosis and embryo development. *Reproduction of Domestic Animals*: p., 2010;

Shimada, T.; Yoshida, H.; Ishihama, A.; Involvement of cyclic AMP receptor protein in regulation of the *rmf* gene encoding the ribosome modulation factor in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*: 195, p.2212-2219, 2013.

Sirotkin, A. V.; Taradajnik, T. E.; Makarevich, A. V; Bulla, J.; Effect of follicular cells, IGF-I and tyrosine kinase blockers on oocyte maturation. *Animal Reproduction Science*: 51, p. 333–344, 1998.

Tao, Y.; Xie, H.; Hong, H.; Chen, X.; Jang, J.; Xia, G.; Effects of nitric oxide synthase inhibitors on porcine oocyte meiotic maturation. *Zygote*: 13, p.1-9, 2005.

Tian, X.; Lonergan, P.; Jeong, B-S.; Evans, A. C. O.; Yang, X. Association of MPF, MAPK and nuclear progression dynamics during activation of young and aged bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*: 62, p.132-138, 2002.

Tornell J, Carlsson B, Billig H. Atrial natriuretic peptide inhibits spontaneous rat oocyte maturation. *Endocrinology*: 126, p.1504–1508, 1990.

Tsafiriri, A.; Dekel, N.; Intra- and intercellular molecular mechanisms in regulation of meiosis in murid rodents. Oocyte maturation and fertilization: a long history for a short event. Editora Bentham Books, p.38-63, 2011.

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*: 102, p.217–227, 2007.

Yamauchi, J.; Miyazaki, T.; Iwasaki, S.; Kishi, I.; Kuroshima, M.; Tei, C.; Yoshimura, Y. Effects of nitric oxide on ovulation and ovarian steroidogenesis and prostaglandin production in the rabbit. *Endocrinology*: 138, p.3630-3637, 1997.

Tabela 1: Efeito dose-resposta da adição de Aminoguanidina (AG) na maturação nuclear de oócitos bovinos cultivados *in vitro*.

	Estádio de maturação nuclear			
	VG	MI	A/T	MII
<b>C +</b>	0,0±0,0 <sup>Cc</sup>	0,0±0,0 <sup>Cd</sup>	21,4±3,9 <sup>Bb</sup>	78,5±3,9 <sup>Aa</sup>
<b>C -</b>	26,8±3,1 <sup>Ca</sup>	32,1±3,5 <sup>Bc</sup>	0,0 C±0,0 <sup>Cc</sup>	41,0 ±4,0 <sup>Ab</sup>
<b>AG (mM)</b>				
<b>1</b>	0,0 ±0,0 <sup>Dc</sup>	31,5±1,7 <sup>Bc</sup>	23,8±4,7 <sup>Cab</sup>	44,7 ±3,2 <sup>Ab</sup>
<b>10</b>	0,0 ±0,0 <sup>Dc</sup>	34,7±3,3 <sup>Bbc</sup>	19,4±4,9 <sup>Cb</sup>	44,8±2,8 <sup>Ab</sup>
<b>50</b>	10,9±1,6 <sup>Db</sup>	38,8±8,4 <sup>Ab</sup>	28,5±4,9 <sup>Ba</sup>	21,7 ±2,4 <sup>Dc</sup>
<b>100</b>	15,2±2,3 <sup>Cb</sup>	62,8±2,2 <sup>Aa</sup>	20,9±4,0 <sup>Bb</sup>	0,0±0,0 <sup>Dd</sup>
<b>150</b>	24,9±1,1 <sup>Ba</sup>	57,5±3,1 <sup>Aa</sup>	17,9±3,9 <sup>Cb</sup>	0,0±0,0 <sup>Dd</sup>

Valores foram expressos como médias ± DP de seis replicatas. Vinte oócitos/tratamento foram utilizados em cada replicata (n=120) para um total de 840 oócitos. As mesmas letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem entre si, segundo o Teste de Tukey (P ≤ 0,05). Controle +: oócitos cultivados sem parede folicular; Controle -: oócitos cultivados na presença de 8 HS de parede folicular, VG - vesícula germinativa, MI - metáfase I, A/T – anáfase/telófase e MII – metáfase II.

Tabela 2: Efeito dose-resposta da adição de 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) na maturação nuclear de oócitos bovinos cultivados *in vitro*.

Tratamento	Estádio de maturação nuclear			
	VG	MI	A/T	MII
<b>C +</b>	0,0±0,0 <sup>Cb</sup>	0,0±0,0 <sup>Ce</sup>	21,4 ±3,2 <sup>Ba</sup>	78,6±16,6 <sup>Aa</sup>
<b>C -</b>	30,2±1,0 <sup>Ba</sup>	31,0±1,0 <sup>Bd</sup>	0,0±0,0 <sup>Cb</sup>	39,1±1,7 <sup>Ab</sup>
<b>ODQ (M)</b>				
<b>10<sup>-5</sup></b>	0,0±0,0 <sup>Db</sup>	45,2±3,3 <sup>Ac</sup>	17,1±4,1 <sup>Da</sup>	35,7±2,5 <sup>Bbc</sup>
<b>10<sup>-4</sup></b>	0,0±0,0 <sup>Db</sup>	50,4±2,1 <sup>Ab</sup>	16,9±1,4 <sup>Ca</sup>	32,9±1,8 <sup>Bc</sup>
<b>10<sup>-3</sup></b>	0,0±0,0 <sup>Cb</sup>	60,3±3,0 <sup>Aa</sup>	17,8±4,7 <sup>Ba</sup>	21,9±3,5 <sup>Bd</sup>

Valores foram expressos como médias ± DP para seis repetições. Vinte oócitos/tratamento foram utilizados em cada repetição (n=120) para um total de 600 oócitos. As mesmas letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem entre si, segundo o Teste de Tukey (P ≤ 0,05). Controle +: oócitos cultivados sem parede folicular; Controle -: oócitos cultivados na presença de 8 HS de parede folicular, VG - vesícula germinativa, MI - metáfase I, A/T – anáfase/telófase e MII – metáfase II.

Tabela 3: Efeito dose-resposta da adição de 8 Bromo-Guanosina 3'5'-monofosfato cíclico (8Br-GMPc) na maturação nuclear de oócitos bovinos cultivados *in vitro*.

Tratamentos	Estádio de maturação nuclear			
	VG	MI	AT	MII
<b>C +</b>	0,0±0,0 <sup>Cb</sup>	0,0±0,0 <sup>Cb</sup>	18,7±4,5 <sup>Ba</sup>	81,3±4,4 <sup>Aa</sup>
<b>C -</b>	31,1±2,3 <sup>Aa</sup>	34,6±7,2 <sup>Aa</sup>	0,0±0,0 <sup>Bb</sup>	34,3±6,7 <sup>Ab</sup>
<b>8Br-GMPc (mM)</b>				
<b>2,5</b>	32,7±3,4 <sup>Aa</sup>	32,6±6,4 <sup>Aa</sup>	0,0±0,0 <sup>Bb</sup>	34,7±4,5 <sup>Ab</sup>
<b>5,0</b>	33,1±2,7 <sup>Aa</sup>	34,0±5,6 <sup>Aa</sup>	0,0±0,0 <sup>Bb</sup>	32,9±4,4 <sup>Ab</sup>
<b>7,5</b>	34,9±3,5 <sup>Aa</sup>	32,1±3,3 <sup>Aa</sup>	0,0±0,0 <sup>Bb</sup>	33,0±6,9 <sup>Ab</sup>
<b>10</b>	34,8±3,5 <sup>Aa</sup>	33,2±2,7 <sup>Aa</sup>	0,0±0,0 <sup>Bb</sup>	32,0±3,2 <sup>Ab</sup>

Valores foram expressos como médias ± DP de seis repetições. Vinte oócitos/tratamento foram utilizados em cada repetição (n=120) para um total de 720 oócitos. Letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem entre si, segundo o Teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Controle +: oócitos cultivados sem parede folicular; Controle -: oócitos cultivados na presença de 8 HS de parede folicular, VG - vesícula germinativa, MI - metáfase I, A/T – anáfase/telófase e MII - metáfase II.

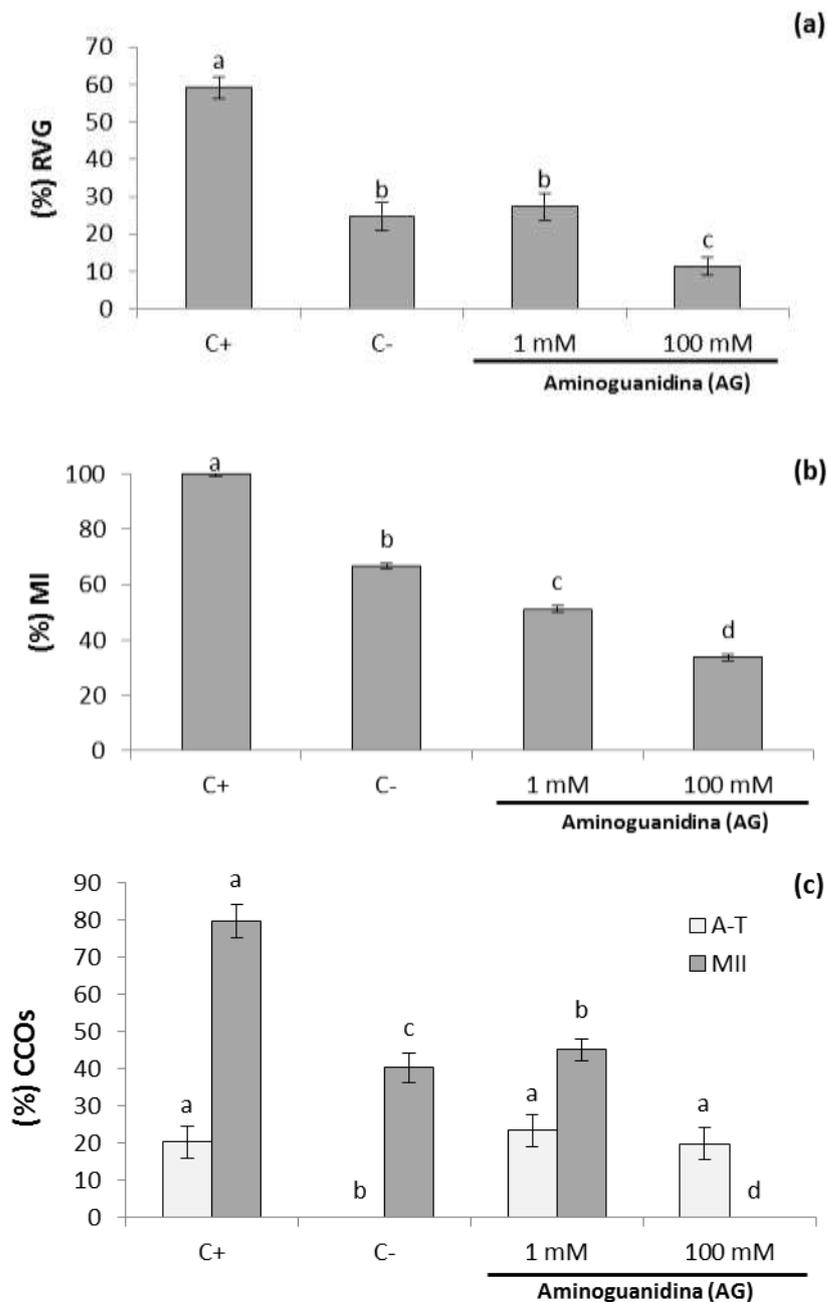


Figura 1. Estágio de maturação nuclear de oócitos bovinos ao longo das 7 (a), 15 (b) e 22 (c) horas de cultivo. Valores foram expressos como médias±DP para seis repetições. Vinte oócitos/tratamento foram utilizados em cada repetição (n=120) para cada horário avaliado, perfazendo um total de 1440 oócitos. As mesmas letras maiúsculas não diferem entre si, segundo o Teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). C+: Controle onde os oócitos foram cultivados sem parede folicular; C-: Controle onde os oócitos foram cultivados na presença de 8 HS de parede folicular, RVG – rompimento da vesícula germinativa, MI – metáfase I, AT – anáfase-telófase e MII - metáfase II.

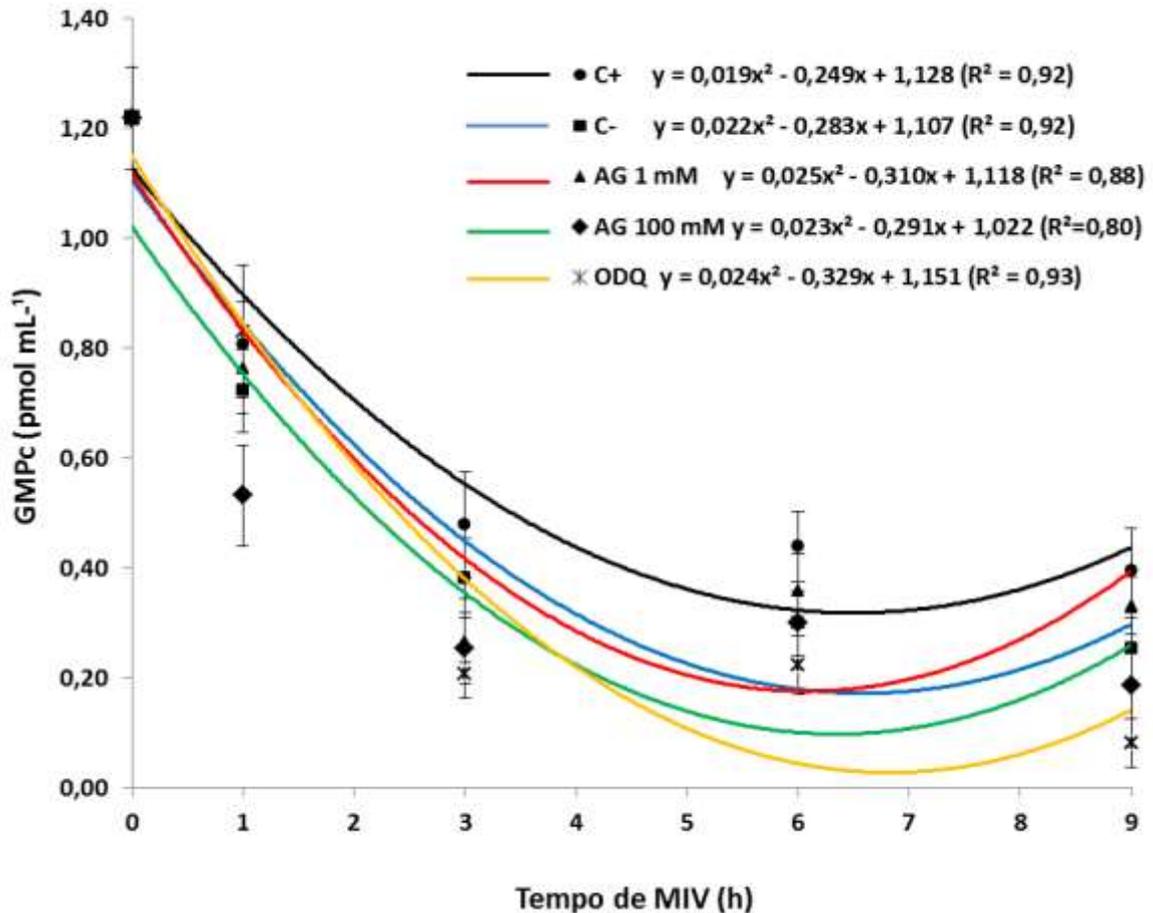


Figura 2. Efeito da suplementação do meio de maturação com aminoguanidina e ODQ na cinética da produção de GMPc (pmol mL<sup>-1</sup>) de CCOs bovinos cultivados *in vitro*. Análise da regressão linear polinomial ( $R^2$ ) das médias  $\pm$  DP de 4 repetições. Trinta CCOs por tratamento foram utilizados em cada repetição ( $n=120$ ) e avaliados às 0, 1, 3 6 e 9 horas, em um total de 2400 CCOs. C+: Controle cultivado na ausência de HS da parede folicular; C-: Controle cultivado na presença de HS foliculares; AG 1mM – Aminoguanidina, AG 100Mm - Aminoguanidina; ODQ:  $10^{-3}$ M de 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one.

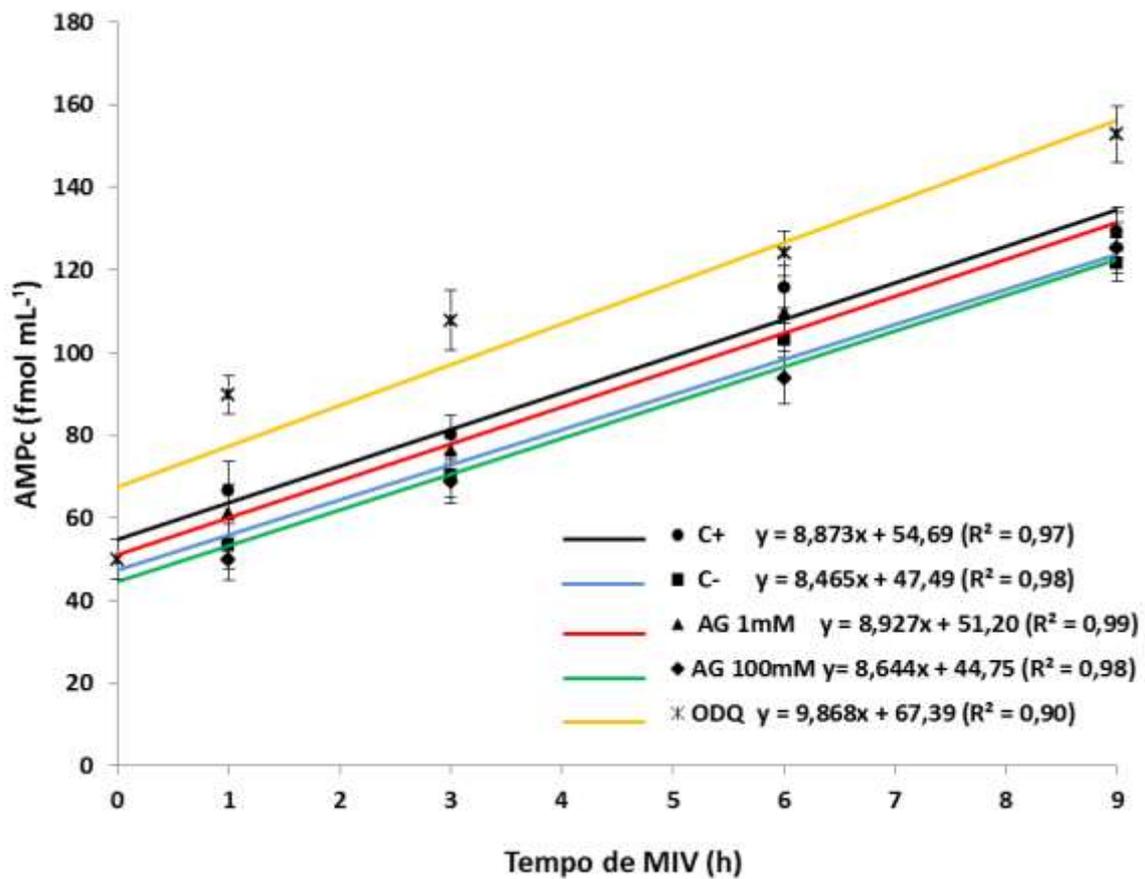


Figura 3. Efeito da suplementação do meio de maturação com aminoguanidina e ODQ na cinética da produção de AMPc (fmol mL<sup>-1</sup>) de CCOs bovinos cultivados *in vitro*. Análise da regressão linear polinomial ( $R^2$ ) das médias  $\pm$  DP de 4 repetições. Dez CCOs por tratamento foram utilizados em cada repetição (n=40) e avaliados às 0, 1, 3, 6 e 9 horas, em um total de 800 CCOs. C+: Controle cultivado na ausência de HS da parede folicular; C-: Controle cultivado na presença de HS foliculares; AG 1mM - Aminoguanidina; AG 100mM - Aminoguanidina; ODQ: 10<sup>-3</sup>M de 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one.

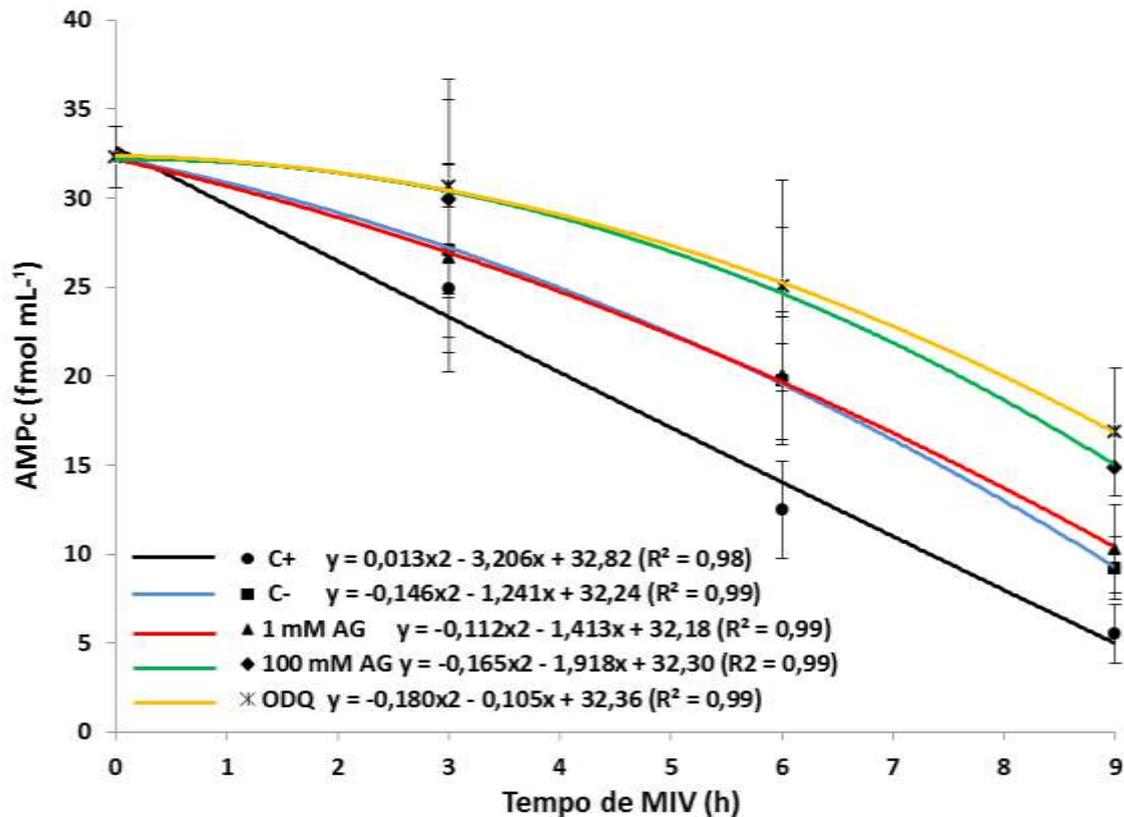


Figura 4. Efeito da suplementação do meio de maturação com aminoguanidina ou ODQ na cinética da produção de AMPc (fmol/mL) de oócitos bovinos cultivados *in vitro*. Valores foram expressos como médias  $\pm$  DP de 4 repetições. Trinta oócitos/tratamento foram utilizados em cada repetição (n=120) em um total de 3000 oócitos. Diferentes letras maiúsculas mostram diferenças entre o mesmo tratamento nas diferentes horas e diferentes letras minúsculas mostram diferenças entre tratamentos na mesma hora ( $P < 0.05$ ). C+: controle positivo; C-: controle negativo, AG 1 mM - aminoguanidina; AG 100 mM – aminoguanidina; ODQ:  $10^{-3}$  M de 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one.

Tabela 4: Integridade de membrana das células do cumulus em função das concentrações de aminoguanidina e 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ).

<b>Tratamentos</b>	<b>Células do <i>cumulus</i> integras</b>
<b>C +</b>	85,9±2,3 <sup>A</sup>
<b>C -</b>	71,2±3,7 <sup>B</sup>
<b>AG (mM)</b>	
<b>1</b>	57,8±12,1 <sup>C</sup>
<b>100</b>	55,3±4,3 <sup>C</sup>
<b>ODQ (M)</b>	
<b>10<sup>-3</sup></b>	49,7±6,8 <sup>D</sup>

Valores foram expressos como médias± DP para seis repetições. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, segundo o Teste de Tukey (P≤ 0,05).

Tabela 5. Efeito da adição de aminoguanidina (AG) e 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one(ODQ) na produção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> no meio de maturação in vitro de CCOs em presença de oito hemisseções (HS) de parede folicular.

<b>Tratamentos</b>	<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (µM)</b>
<b>C+</b>	18,87±1,44 <sup>D</sup>
<b>C -</b>	36,63±3,15 <sup>B</sup>
<b>AG (mM)</b>	
<b>1</b>	31,42±1,67 <sup>C</sup>
<b>100</b>	36,59±1,06 <sup>B</sup>
<b>ODQ (M)</b>	
<b>10<sup>-3</sup></b>	62,65±2,21 <sup>A</sup>

Valores foram expressos como médias±DP de quatro repetições. Médias seguidas de letras diferentes dentro da mesma coluna significam que houve diferença (P<0,05). Controle +: oócitos cultivados sem hemisseções da parede folicular. Controle -: oócitos cultivados na presença de 8 HS de parede folicular.

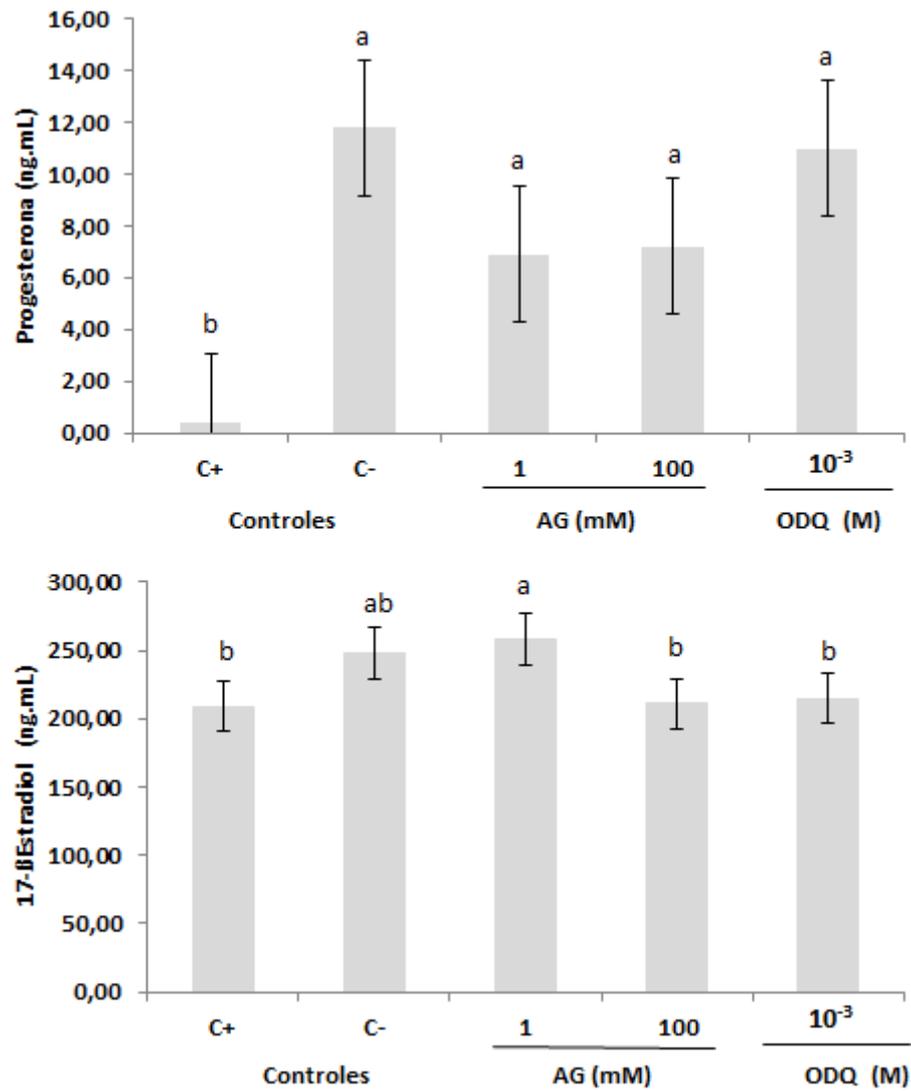


Figura 5. Efeito da adição de aminoguanidina (AG) e 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one(ODQ) na concentração de progesterona (P4) e 17β-estradiol (E2) no meio de maturação de CCOs cocultivados com hemisseções de parede folicular durante 22 horas.