

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

KELEN SALAROLI VIANA

**MORFOLOGIA E BIOQUÍMICA DOS EFEITOS DO ÓXIDO NÍTRICO
NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS *IN VITRO***

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
2009

KELEN SALAROLI VIANA

**MORFOLOGIA E BIOQUÍMICA DOS EFEITOS DO ÓXIDO NÍTRICO
NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS *IN VITRO***

**“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro, como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor(a) em Ciência
Animal.”**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Maria Clara Caldas Bussiere

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
2009

MORFOLOGIA E BIOQUÍMICA DOS EFEITOS DO ÓXIDO NÍTRICO NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS *IN VITRO*

KELEN SALAROLI VIANA

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor(a) em Ciência Animal.

Aprovada em 30 de janeiro de 2009

Comissão Examinadora:

Prof^o Felipe Zandonadi Brandão (Doutor, Ciência Animal) – UFF

Prof^o Renato Augusto DaMatta (Doutor, Ciências Biológicas) – UENF

Prof^a Elena Lassounskaia (Doutora, Imunologia) – UENF

Prof^o Angelo José Burla Dias (Doutor, Biociências) – UENF

Prof^a Maria Clara Caldas Bussiere (Doutora, Fisiologia Animal) – UENF
(Orientador)

**À minha jóia preciosa David,
por ser a razão da minha vida e me trazer tanta alegria;**

**Aos meus amados pais Ralph e Ilizabete,
pela vida e ensinamentos que levarei por toda a vida;**

**Ao meu querido marido Walker,
por todo amor e paciência a mim dispensados**

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor de todas as coisas e Dono da minha vida. Obrigada por cada respiração, cada gesto preciso das minhas mãos, cada pensamento coordenado, por ter força toda manhã e conseguir trabalhar. Obrigada pela vida!!!

À minha orientadora Prof(a) Dr.(a) Maria Clara, pelo apoio, dedicação, interesse, horas de dedicação, o meu muito obrigada;

Ao Prof. Dr. Angelo José Burla Dias, pela colaboração imensurável nesse trabalho, disponibilidade para esclarecimentos, interesse, conhecimentos transmitidos e amizade;

À Prof.(a) Dr. (a) Célia Raquel Quirino, pelas orientações e análises estatísticas dos resultados;

À Ms. Carla Paes de Carvalho, pela amizade e auxílio indispensável na execução de cada etapa deste trabalho. Obrigada!!!!

À amiga Bruna Lomba Dias, pelo companheirismo, dedicação e amizade;

Aos amigos pós-graduandos, graduandos e bolsistas de apoio;

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 a CAPES pela concessão de Bolsa de Estudo;

Ao Laboratório de Biologia do Reconhecer, especialmente à Prof(a) Dr.(a) Elena, Rita e Verônica, pela ajuda a esse trabalho, meus sinceros agradecimentos;

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

RESUMO

VIANA, Kelen Salaroli, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense. Janeiro de 2009. Morfologia e bioquímica dos efeitos do óxido nítrico na maturação de oócitos bovinos *in vitro*. Professor(a) Orientador (a): Maria Clara Caldas Bussiere

O objetivo do presente estudo foi de avaliar alterações morfológicas e bioquímicas causadas pela adição de óxido nítrico (NO) no meio de maturação. Primeiramente foi avaliado se as diferentes formas de cultivo (gota de 150µL de meio coberta com óleo x placa de quatro poços com 500µL de meio) interferem no efeito do NO sobre maturação e a integridade da membrana plasmática do complexo *cumulus*-oócito de bovinos pela adição de diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (SNP; 0, 10⁻⁵ e 10⁻³ M), doador de óxido nítrico (NO). Não foi observada diferença (P>0,05) entre as formas de cultivo quando se avaliou a integridade de membrana e expansão das CC. Contudo, com relação à integridade de membrana dos oócitos, foi observado que oócitos dos grupos controle e 10⁻³M de SNP cultivados em placa apresentaram maior porcentagem de membrana íntegra do que os cultivados em gota (P<0,05). Com relação ao tipo de tratamento, a adição de 10⁻³M de SNP causou um efeito inibitório na expansão e integridade da membrana das CC e oócito, tanto no cultivo em gotas sob óleo quanto em placa, diferindo do controle e do 10⁻⁵ M de SNP (P<0,05). Semelhante à expansão, a forma de cultivo não interferiu na extrusão do primeiro corpúsculo polar (P>0,05), porém, a adição de 10⁻³M de SNP inibiu esta tanto no cultivo em gotas quanto em placa (P<0,05). A concentração de NO no meio de cultivo foi maior quando se adicionou 10⁻³M de SNP em ambos os tipos de cultivo (P<0,05). Esses dados mostram que o sistema de cultivo em placa é o mais recomendado. Sendo assim, em seguida foi avaliado o efeito da adição de diferentes concentrações de SNP na maturação *in vitro* de oócitos bovinos após 24 h de cultivo, utilizando o sistema de cultivo em placa. Foi observado que a adição de 10⁻⁵ M de SNP não alterou a viabilidade e integridade da membrana plasmática, porém a adição de 10⁻³ M promoveu perda da viabilidade e integridade da membrana plasmática de todos os oócitos (P<0,05). Além disso, após a adição de 10⁻³ M de SNP não ocorreu a organização do citoesqueleto. A adição de 10⁻⁵ M aumentou a porcentagem de migração dos grânulos corticais (P<0,05), porém não houve diferença entre o grupo controle e o tratado com 10⁻³ M de SNP (P>0,05). A concentração de NO no meio de cultivo aumentou à medida que a concentração de SNP adicionada ao meio aumentou (P<0,05) e após a adição de 10⁻³ M de SNP, a concentração de glutatona diminuiu (P<0,05).

Também foi observado um aumento no número de células totais no embrião eclodido quando se adicionou 10^{-5} M de SNP. Esses resultados mostram que: 1) o sistema de cultivo em placas é mais recomendado; 2) a adição de 10^{-5} M de SNP aumentou a qualidade da maturação oocitária, apresentando uma maior percentagem de migração de grânulos corticais e número de células embrionárias totais no blastocisto eclodido; 3) a adição de 10^{-3} M de SNP causou um efeito citotóxico, levando a morte celular, porém não alterou a distribuição dos grânulos corticais.

Palavras-chave: bovino, FIV, MIV, oócito, óxido nítrico.

ABSTRACT

VIANA, Kelen Salaroli, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense. 2009 January. Morphology and biochemist of the effect of nitric oxide in the maturation of bovine oocyte *in vitro*. Professor Adviser: Maria Clara Caldas Bussiere

The objective of the present study was to evaluate morphologic and biochemists alterations caused by the addition of nitric oxide (NO) the one in the medium of maturation. First it was evaluated if the different forms of culture (drop of 150 μ L of medium covered with oil x plate of four wells with 500 μ L of medium) intervene with the effect of the NO on maturation and the integrity of the plasmatic membrane of the cumulus-oocyte complex of bovines for the addition of different concentrations of sodium nitroprusside (SNP; 0, 10⁻⁵ and 10⁻³ M), nitric oxide giver (NO). Difference was not observed (P> 0,05) among the culture forms when evaluated the integrity of membrane and expansion of the CC. However, with regard to the integrity of membrane of the oocytes, it was observed that oocytes of the groups control and 10⁻³M of SNP cultivated in plate had presented greater percentage of cells that has not lost the integrity of its plasma membrane of what was cultivated in drop (P<0,05). With regard to the type of treatment, the addition of SNP 10⁻³M caused an inhibitory effect in the expansion and integrity of the membrane of CC and the oocyte, as much in the culture in drops under oil as in plate, differing from the control and the 10⁻⁵ M of SNP (P P<0,05) Fellow the expansion, the culture form did not intervene with the drawing of the first polar corpuscle (P> 0,05), however, the addition of SNP 10⁻³M in such a way inhibited this in the culture in drops as much in plate (P<0,05). The concentration of NO on the medium of culture was bigger when added to 10⁻³M of SNP in both types of culture (P<0,05). These data show that the system of culture in plate is recommended. Being thus, after that evaluated the effect of the addition of different concentrations of SNP in the maturation *in vitro* of bovine oocytes after 24h of culture, using the system of culture in plate. It was observed that the addition of 10⁻⁵ M of SNP did not modify the viability and integrity of the plasmatic membrane, however the addition of 10⁻³ M promoted loss of the viability and integrity of the plasmatic membrane of all the oocyte (P<0,05). Moreover, after the addition of 10⁻³ M of SNP did not occur the organization of cytoskeleton. The addition of 10⁻⁵ M increased the percentage of migration of cortical granules (P<0,05), however it did not have difference between the group control and 10⁻³ M of SNP (P>0,05). The concentration of NO on the medium of culture increased the measure that the concentration of SNP added to the way increased

($P < 0,05$), and after the addition of 10^{-3} M of SNP, the concentration of glutathione diminished ($P < 0,05$). Also an increase in the total cells number embryo was observed when 10^{-5} M of SNP was added. These results show that: the 1) system of culture in plates is more recommended; 2) the addition of 10^{-5} M of SNP increased the quality of the oocyte maturation, presenting a bigger percentage of cortical granule migration and total number embryonic in blastocist come out; 3) the addition of 10^{-3} M of SNP caused a cytotoxic effect, taking the cellular death, however it did not modify the distribution of cortical granules.

Key-words: bovine, FIV, MIV, oocyte, nitric oxide

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1: Síntese de ciclina B controla o tempo de maturação meiótica pela ação do MPF (BRUNET e MARO, 2005)23

Artigo 1:

Figura 1: Fotomicrografia representativa da expansão e integridade de membrana das células do *cumulus*. De A a C: Expansão das células do *cumulus* de COC cultivados em 0 (A – controle), 10^{-5} (B) e 10^{-3} M de SNP (C). De D a F: Integridade das células do *cumulus* de COC cultivados na ausência de SNP (D – controle) e após a adição de 10^{-5} (E) e 10^{-3} M de SNP (F). Células marcadas em vermelho (brometo de etídio) indicam células com perda da integridade de membrana e em verde (laranja de acridina) indicam células com membrana íntegra. Células do *cumulus* de cada tratamento mostraram comportamento semelhante nas diferentes formas de cultivo. As CC mostradas são de COC cultivados em placas.....78

Figura 2: Concentração de NO no meio de maturação *in vitro* de complexos *cumulus*-oócito (n=30) cultivados em gota (150 μ L) coberta com óleo mineral e placa de quatro poços (500 μ L). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes (A-C) mostram diferença (P<0,05) para cada tratamento cultivado em gota. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes (a-c) mostram diferença (P<0,05) para cada tratamento cultivado em placa. (*) = diferença entre formas de cultivo. Os dados representam a média \pm SD de quatro repetições.....79

Artigo 2:

Figura 1: Fotografias representativas da integridade da membrana plasmática dos oócitos bovinos cultivados com diferentes concentrações de nitroprussiado de sódio (SNP). A – oócito cultivado em 10^{-3} M de SNP e B – oócito cultivado com 0 M de SNP (controle). Cromatina marcada em azul indica membrana plasmática íntegra (hoescht) e cromatina marcada em vermelho indica lesão de membrana plasmática (iodeto de propídio). A seta indica a presença do corpúsculo polar.....110

Figura 2: Concentração de nitrato/nitrito no meio de maturação *in vitro* de complexos *cumulus*-oócito após a adição de diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (SNP).
^{a-c}Diferentes letras indicam diferença significativa entre tratamentos (P<0,05). Dados são apresentados como média ± S.E.M de quatro repetições.....111

Figura 3: Fotomicrografias representativas de oócitos bovinos expostos a 0 (controle) e 10^{-3} M de nitroprussiato de sódio (SNP) avaliados quanto à dinâmica nuclear, de microtúbulos e dos microfilamentos. A-F: controle e G-H: 10^{-3} M de SNP. Categorias de oócitos encontradas: de A a C - oócito em metáfase II com microtúbulos evidentes tanto no citoplasma do oócito quanto no corpúsculo polar; de D a F - oócito em metáfase I com microtúbulos evidentes no mesmo local; G e H - oócito com cromatina compacta, ausência de microtúbulos e filamentos em grumos (*clusters*). Material nuclear em azul (Hoescht), microtúbulos em verde (FITC) e microfilamentos em vermelho (rodamina).....112

Figura 4: Efeito da adição de diferentes concentrações de SNP (0, 10^{-5} e 10^{-3} M) no meio de maturação na percentagem de extrusão do PB1. ^{a-b}Diferentes letras indicam diferença significativa entre tratamentos (P<0,05). Números entre parênteses indicam o número total de oócitos examinados. Dados são apresentados como média ± S.E.M de quatro repetições em percentagem113

Figura 5: Dinâmica da distribuição dos grânulos corticais marcados com *Lens culinares-FITC*. A - oócito imaturo com GC distribuídos em grupos (dispersos), B - oócito parcialmente maturo com GC periféricos e em grupos (e dispersos) e; C - oócito maturo com GC periféricos.....114

Figura 6: Concentração de glutathiona em oócitos bovinos maturados na presença de 0, 10^{-5} e 10^{-3} M de SNP. Colunas sem letra igual são diferentes ($P < 0,05$). ^{a-b}Diferentes letras indicam diferença significativa entre tratamentos ($P < 0,05$). Números entre parênteses indicam o número total de oócitos examinados. Dados são apresentados como média \pm S.E.M de quatro repetições. (aumentar a letra do título do eixo x e y e não colocar em 3D, para ficar pronto para a publicação).....115

LISTA DE TABELAS

Artigo 1:

Tabela 1: Efeito da adição de diferentes concentrações de SNP durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos na expansão das CC em diferentes formas de cultivo75

Tabela 2: Integridade das células do *cumulus* e dos oócitos de COC cultivados em diferentes formas de cultivo (em gotas cobertas com óleo ou em placas de quatro poços) com adição de diferentes concentrações de SNP.....76

Tabela 3: Extrusão do primeiro corpúsculo polar de oócitos cultivados em diferentes formas de cultivo (em gotas cobertas com óleo ou em placas de quatro poços) após a adição de diferentes concentrações de SNP77

Artigo 2:

Tabela 1: Viabilidade e integridade da membrana plasmática de oócitos bovinos maturados *in vitro* (24 h) após a adição de diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (SNP).....107

Tabela 2: Distribuição dos grânulos corticais de oócitos bovinos maturados *in vitro* (24 h) em meio contendo diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (SNP).....108

Tabela 3: Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos fertilizados *in vitro* após maturação em meio suplementado com diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (SNP).....109

LISTA DE ABREVIATURAS

AC – Adenilato ciclase
AI – Anáfase I
AMPc – adenosina monofosfato cíclica
BSA – Soroalbumina Bovina
Ca²⁺ – Cálcio
CDKs – ciclinas dependentes de cinases
COC – Complexo *cumulus* oócito
CO₂ – Gás carbônico
CSF – fator citostático
E₂ – Estradiol
ERK – cinase regulada extracelular
FIV – Fertilização *in vitro*
FSH – Hormônio folículo estimulante
GC – grânulo cortical
GMPc – guanosina 3' 5' - monofosfato cíclica
GPR3 – receptor acoplado a proteína Gs
GSH – glutationa
hCG – Gonadotrofina Corionica Humana
iAC – Adenilato ciclase invasiva
IαI – inibidor da inter-α-tripsina
IBMX – 3 isobutil metil xantina
LH – Hormônio luteinizante
L - NAME – N^w-nitro-L-arginina metil éster
MAPK – MAP cinase
MIV – Maturação *in vitro*
MI – Metáfase I
MII – Metáfase II
MPF – Fator promotor da maturação
MTOCs – centros organizadores de microtúbulos
NaCl – Cloreto de sódio
NO – Óxido nítrico
NO₂⁻ – Nitrito

NO_3^- – Nitrato

NOS – óxido nítrico sintase

cNOS - óxido nítrico sintase constitutível

nNOS - óxido nítrico sintase neuronal

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

O_2 – Oxigênio

O_2^- – Superóxido

ONOO^- – Peroxinitrito

PDE – Fosfodiesterase AMPc

PIV – Produção *in vitro*

PKA – Proteína cinase A

PKC – Proteína cinase C

PVA – álcool polivinílico

RVG – Rompimento da vesícula germinativa

SB – Solução de bloqueio

SFB – Soro fetal bovino

SNAP – S-nitroso-*N*-acetilpenicilamina

SNP – Nitroprussiato de sódio

TCM – Meio de cultura de tecidos

TI – Telófase I

$\text{TNF}\alpha$ – Fator tumoral

TPZ – Projeção transzonal

TSG-6 – fator de necrose tumoral estimulado pelo gene 6

VG – Vesícula germinativa

ZP – Zona Pelúcida

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
OBJETIVOS.....	2
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
1. Maturação oocitária.....	3
1.1. Maturação nuclear.....	3
1.2. Maturação citoplasmática.....	4
1.3. Maturação molecular	5
2. Controle da maturação oocitária	6
2.1 AMPc/proteínas cinases	6
2.2 MPF/MAPK	7
2.3 Hormônios esteróides.....	9
2.4 Antioxidantes	10
2.4.1 Antioxidantes enzimáticos	11
2.5 NO	15
3. Alterações morfológicas durante a maturação	19
3.1 Citoesqueleto	19
3.2 Grânulos corticais	25
4. Apoptose	25
4.1 Reguladores do processo apoptótico.....	26
4.2 No ovário.....	29
4.3 Nas células foliculares.....	30
4.4 Nas células do <i>cumulus</i>	30
4.5 No oócito	31
4.6 Ação do NO na apoptose	32

5. Células do <i>cumulus</i> – oócito	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
TRABALHOS	62
Efeito da adição de óxido nítrico na integridade de membrana e expansão das células somáticas de complexos <i>cumulus</i> -oócito de bovinos em diferentes formas de cultivo.....	63
Resumo.....	63
Abstract	64
Introdução.....	65
Material E Método.....	66
Resultados.....	69
Discussão.....	70
Conclusões.....	72
Agradecimentos.....	73
Referências.....	73
Efeito do óxido nítrico na integridade celular, organização do citoesqueleto, maturação nuclear e citoplasmática do complexo <i>cumulus</i> –oócito bovino cultivado <i>in vitro</i>	80
Resumo.....	81
1. Introdução	82
2. Material e métodos	84
3. Resultados	92
4. Discussão	94
5. Referências	98

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A obtenção de um maior número e qualidade de embriões produzidos *in vitro* vem sendo o objetivo de inúmeras linhas de pesquisa. Porém, apesar do progresso realizado na otimização dos sistemas de cultura para maturação, fertilização e produção de embrião *in vitro*, apenas cerca de 40% dos oócitos obtidos de ovários de matadouros alcançam o estágio de desenvolvimento até blastocisto (LONERGAN et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006). Essas baixas taxas são influenciadas por vários fatores que atuam durante cada uma das etapas do processo.

Um desses fatores é a condição de cultivo, que exerce forte influência durante a maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos. Visto que a maturação completa é essencial para o desenvolvimento embrionário, um dos caminhos para se tentar aumentar o número e a qualidade de blastocistos produzidos *in vitro* seria a realização de estudos mais aprofundados das substâncias adicionadas ao meio de maturação e o seu mecanismo de ação.

O óxido nítrico (NO), um radical livre e gás altamente difuso e lipolítico, é um importante mensageiro inter e intracelular que está envolvido em várias etapas do processo reprodutivo (comportamento sexual, esteroidogênese, sobrevivência folicular, ovulação, fertilização e implantação embrionária) (ROSSELLI et al., 1998; DIXT e PARVIZI, 2001; THALER e EPEL, 2003). Foi demonstrado em oócitos de bovinos (MATTA et al. 2009; SCHWARZ et al., 2008; VIANA et al., 2007) suínos (BU et al., 2002, 2003) e ratos (TAO et al., 2004) que o NO também tem participação no processo de maturação meiótica, mostrando que o NO possui um papel diferenciado na regulação da maturação oocitária, variando seu mecanismo de atuação conforme sua concentração presente no meio.

Em estudo prévio do laboratório, foi demonstrado que o NO possui um efeito duplo na maturação *in vitro* de oócitos bovinos, podendo ter um efeito deletério quando em alta concentração, inibindo a progressão da meiose, ou um efeito benéfico quando em concentração intermediária, aumentando a migração dos grânulos corticais e a taxa de blastocistos produzidos *in vitro* (VIANA et al. 2007).

Estudos são necessários para se compreender melhor a ação do óxido nítrico durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, visando aumentar o número e qualidade de embriões produzidos *in vitro*, assim como um maior entendimento de enfermidades reprodutivas que envolvem alteração na sua concentração.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar a ação do NO nas células do *cumulus* em diferentes formas de cultivo e as alterações morfológicas e bioquímicas causadas pela adição de diferentes concentrações de NO no meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos

Específicos

Avaliação de alterações nas células do *cumulus* causadas pelo NO por meio da observação:

- da morte celular por meio da avaliação da integridade da membrana plasmática (laranja de acridina/brometo de etídio)
- da expansão celular

Avaliação das alterações morfológicas causadas pelo NO por meio da:

- observação da morte celular por meio da avaliação da integridade da membrana plasmática (laranja de acridina/brometo de etídio; hoescht/iodeto de propídio) e da ocorrência de apoptose (anexinaV);
- determinação da migração dos grânulos corticais e do citoesqueleto.
- avaliação do desenvolvimento embrionário

Avaliação das alterações bioquímicas causadas pelo NO por meio da:

- determinação da concentração de NO no meio de maturação
- avaliação da concentração intracelular de glutathiona

REVISÃO DE LITERATURA

1. Maturação oocitária

Oócitos são formados durante a vida fetal e são mantidos no estágio de prófase I da primeira divisão meiótica. Após a puberdade, oócitos que alcançaram seu tamanho final, entram no estágio de vesícula germinativa (VG) (GINTHER et al., 2001). Durante o ciclo estral, a retomada da meiose ocorre em resposta ao pico de LH e após este os oócitos entram no estágio de metáfase da segunda divisão meiótica (MII). Este processo é chamado de maturação oocitária e além da retomada da meiose (maturação nuclear) também faz parte desse processo a aquisição da competência oocitária (maturação citoplasmática) (BEVERS et al., 1997) e o controle da expressão gênica (maturação molecular) (JENUWEIN e ALLIS, 2001). Uma série de transformações bioquímicas e estruturais no núcleo e no citoplasma do oócito imaturo é necessária para torná-lo hábil à fecundação e à produção de um embrião viável (MACHATKOVA et al., 2004).

1.1. Maturação nuclear

A maturação nuclear envolve uma cascata de eventos nucleares, sendo induzida após o pico de LH ou pela remoção do oócito do ambiente folicular. Ela compreende o processo de reversão do primeiro bloqueio meiótico em VG até o segundo bloqueio em MII. Esses eventos são programados para ocorrerem no oócito após a remoção de algumas substâncias ainda não totalmente definidas (SIRARD et al., 2006). Durante esse período, o oócito realiza duas divisões celulares sem uma fase intermediária de replicação do DNA, produzindo assim um gameta funcional (BRUNET e MARO, 2005).

A retomada da meiose se inicia com o rompimento da vesícula germinativa (RVG), passando pela metáfase I, anáfase I, telófase I e então rapidamente chega à metáfase da segunda divisão meiótica (MII). As alterações morfológicas no núcleo envolvem o desaparecimento do envelope nuclear, formação dos microtúbulos, alinhamento dos cromossomos na placa metafásica (MI), separação dos cromossomos homólogos e extrusão do primeiro corpúsculo polar (SIRARD et al., 1989, JONES, 2004).

A segregação das cromátides irmãs precisa ser igual para manter a ploidia correspondente. Quando as cromátides irmãs se encontram no fuso metafásico, elas tornam-se completamente alinhadas. Todos os cinetócoros são ocupados pelos microtúbulos e a

tensão de retirada dos cinetócoros atua como um sinal para o início da anáfase. As proteínas do ciclo celular que mantêm a metáfase são degradadas. A saída da metáfase é alcançada pelo complexo promotor da anáfase (APC/C), uma subunidade do complexo ligase E3 que tem a habilidade de unir este substrato a uma pequena proteína de baixo peso molecular, a ubiquitina (ZACHARIAE e NASMYTH, 1999). Na metáfase, a poliubiquinação da ciclina B pela APC/C leva a uma diminuição da atividade do fator promotor da maturação (MPF), permitindo assim o desenvolvimento para o estágio anáfase. A degradação da ciclina B também é requerida para que ocorra a extrusão do primeiro corpúsculo polar (HERBERT et al., 2003).

1.2. Maturação citoplasmática

A maturação citoplasmática não está ainda tão bem definida quanto o processo meiótico, sendo que ela envolve tanto mudanças que podem ser observadas em microscópio quanto aquelas que não podem ser visualizadas. A descrição da maturação citoplasmática é baseada em observações estruturais durante poucos minutos antes do pico de LH. O compartimento citoplasmático é caracterizado pelo contínuo desenvolvimento de estoques de lipídios no oócito, redução do aparato de Golgi e alinhamento dos grânulos corticais formando uma barreira para bloquear a poliespermia. Também há o aparecimento de numerosos ribossomos próximos aos cromossomos (KRUIP et al., 1983). A maioria das organelas migra para o centro da célula modificando sua aparência. Essa migração é dependente dos microtúbulos e microfilamentos do citoesqueleto, e o reposicionamento de cada organela no citoplasma depende da necessidade da célula durante cada estágio do desenvolvimento (HYTTEL et al., 1997; KIM et al., 1996; FERREIRA et al., 2009)

Durante esse processo, também ocorre o acúmulo de moléculas específicas, em sua maior parte não identificadas, que preparam o oócito para eventos após a fertilização (HUMBLOT et al., 2005). A síntese de proteínas é indispensável não apenas para a maturação do oócito, mas também para a formação do zigoto e embriogênese inicial. Durante a metáfase I, a síntese de proteína no oócito é aproximadamente três vezes maior que durante o estágio de RVG. Para isso, uma quantidade apropriada de ribossomos precisa estar presente durante a maturação. Evidências sugerem que a produção de ribossomos durante o estágio de VG pode favorecer um maior estoque dessas organelas no oócito durante o estágio de MI (VAN BLERKOM et al., 2000).

O correto posicionamento e o movimento ativo das organelas são essenciais para o crescimento, a maturação e fertilização dos oócitos. Durante o crescimento de oócitos de mamíferos, as organelas se movem para o córtex celular, formando uma zona de organelas, enquanto que durante a maturação oocitária, elas se movem centralmente (com exceção dos grânulos corticais), formando uma zona livre de organelas no córtex dos oócitos maduros (SUN e SCHATTEN, 2006).

As mitocôndrias se acumulam na área periférica durante a progressão da fase de RVG para anáfase I. Grandes focos de mitocôndrias são formados e movimentados para o interior do citoplasma de oócitos maduros. Esse movimento é mediado pelos microtúbulos, e não pelos microfilamentos (SUN et al., 2001). Antes da ativação genômica embrionária, a mitocôndria tem níveis intermediários de atividade, um fato que pode ser explicado pela proteção adaptativa contra a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), como resultado do metabolismo mitocondrial (NOHL et al., 2005; VAN BLERKOM, 2008). Essa proteção é realizada por moléculas antioxidantes, como a glutatona e peroxidases, que são produzidas durante a maturação oocitária ou durante o estágio embrionário de 2-células (LONERGAN et al., 2000).

Mudanças bioquímicas e estruturais no retículo endoplasmático (RE) durante a maturação são necessárias para uma apropriada regulação da liberação de cálcio intracelular. Análises de oócitos de camundongos *in vivo* no estágio de VG mostraram que o RE está uniformemente distribuído no ooplasma. Com a progressão para o estágio de MII, o RE passa a se encontrar na região cortical e se acumula em pequenos grupos pelo citoplasma (STRICKER, 2006).

1.3. Maturação molecular

Uma das últimas definições de um dos processos da maturação oocitária é chamada de maturação molecular. Acredita-se que a maturação molecular representa uma associação íntima com a capacidade intrínseca do oócito em alcançar o estágio de blastocisto, e até mesmo estádios mais avançados (SIRARD et al., 2006). Ela corresponde às fases de crescimento e maturação do oócito e está envolvida na transcrição, estoque e processamento de RNAm expresso pelos cromossomos, os quais serão futuramente traduzidos em proteínas pelos ribossomos (SIRARD, 2001).

O RNAm transcrito durante a maturação molecular de oócitos é acumulado de forma estável (TOMEK et al., 2002). Ele se mantém estocado até que ocorra a sinalização para sua

tradução, que é gerada durante a maturação e desenvolvimento embrionário inicial (FULKAJR et al., 1998). Vários mecanismos estão envolvidos na ativação do RNAm (TOMEK et al., 2002). A poliadenização (adição de adenina), formando uma cauda poli-(A), inicia a translação, e esta poliadenização está relacionada ao desenvolvimento embrionário (BREVINI et al., 2002).

Os principais transcritos produzidos durante a maturação molecular do complexo *cumulus*-oócito codificam: reguladores do ciclo celular, como o fator promotor da maturação (MPF) e por proteína quinase ativador mitógeno (MAPK) (CALDER et al., 2003); proteínas e moléculas que são indicadoras da maturação citoplasmática, como a glutathione (ALI et al., 2003) e moléculas de ATP (STOJKOVIC et al., 2001); e componentes do sistema de enzimas antioxidantes como a catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase (CETICA et al., 2001).

2. Controle da maturação

2.1. AMPc/ proteínas quinases

Momentos antes do pico de LH, o oócito que atingiu seu tamanho máximo adquire habilidade para iniciar a maturação. A aquisição da competência meiótica normalmente ocorre ao mesmo tempo em que o antro folicular é formado (MEHLMANN et al., 2004) e corresponde ao ponto no qual o oócito adquire um nível adequado de proteínas promotoras da maturação, como a CDK1 (quinase dependente de ciclina) e ciclinas (KANATSUSHINOHARA et al., 2000). Também está bem estabelecido que o bloqueio meiótico é regulado por níveis de AMPc dentro do oócito (EPPIG et al., 2004).

Uma hipótese para como os níveis de AMPc são mantidos altos, é que o próprio oócito poderia estar produzindo seu próprio AMPc a partir de um receptor para proteína G na membrana plasmática oocitária que estimula a Gs, uma proteína ligada à proteína G, a ativar a adenilato ciclase (AC) (MEHLMANN et al., 2002; 2004). O receptor acoplado a Gs (GPR3), foi identificado como um regulador essencial do bloqueio meiótico em oócitos de camundongos (MEHLMANN et al., 2004). Esse receptor exhibe um alto grau de atividade constitutiva quando expresso em várias linhas celulares, resultando em um alto nível de produção do AMPc (UHLENBROCK et al., 2002). A atividade constitutiva do GRP3 no oócito é suficiente para produzir a quantidade de AMPc requerida para o bloqueio meiótico.

A interrupção da comunicação *cumulus*-oócito, após o estímulo pelas gonadotrofinas, pode levar à diminuição da concentração de AMPc no interior do oócito, podendo assim, ocorrer a retomada da meiose, mostrando que o AMPc funciona como um regulador da maturação nuclear em oócitos de mamíferos (BILLIG *et al.*, 1988; EPPIG, 1989).

A diminuição da concentração de AMPc é de grande importância para a maturação do oócito, pois leva à diminuição da fosforilação de certas proteínas pela ação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA). Esta quinase é parte de uma cascata sinalizadora. A AC converte ATP em AMPc. Esta atividade é controlada pela proteína G. Uma vez produzido, o AMPc se liga à subunidade regulatória da PKA. Porém, para controlar o nível intracelular de AMPc, a fosfodiesterase (PDE) transforma AMPc em 5'-AMP, o qual não é capaz de ativar a PKA. Estando ativa, a PKA fosforila resíduos de serina ou treonina do MPF, deixando-o na sua forma inativa, impedindo assim a retomada da meiose (SIRARD *et al.*, 1998).

Em adição à via pela PKA, a proteína quinase C (PKC) parece estar envolvida na regulação da maturação meiótica (DOWNS *et al.*, 2001). A PKC é uma serina treonina que participa de vários eventos do ciclo de transição celular da maturação de oócitos (VIGNOLA, 1995). A PKC, estimula a maturação nuclear de oócitos em bovinos (VIGNOLA, 1995) e suínos (SU *et al.*, 1999). É sugerido que, de forma semelhante à PKA, existe um sistema de compartimentalização entre o oócito e células do *cumulus* para diferentes isoformas de PKC, o qual pode ser modulado por ativadores celulares específicos que manipulam o controle da maturação oocitária.

2.2. MPF/MAPK

Durante o ciclo celular, a fase M é controlada pela ativação/inativação do MPF (MASUI e MARKERT, 1971), uma proteína composta por uma subunidade catalítica, p34^{cdc2} e por uma subunidade regulatória, ciclina B (DOREE e HUNT, 2002; JONES, 2004). A modulação da concentração da ciclina, por sua síntese e degradação, é de importância central no controle da atividade do MPF (MURRAY e KIRSCHNER, 1989). Em oócitos, o controle do tempo da maturação meiótica depende da ciclina B. Mudanças nos níveis de ciclina B acarretam em mudanças na atividade do MPF, regulando não apenas o tempo das fases do ciclo durante a meiose, mas também a sua ordem.

O MPF é ativado no RVG e aumenta até atingir um nível máximo no final da primeira divisão meiótica (VERLHAC *et al.*, 1994). Uma diminuição na atividade do MPF

ocorre na transição entre MI e MII, sendo rapidamente reativado assim que se inicia a MII e mantido elevado por todo o período em que permanece em MII.

Oócitos imaturos contêm pequenas quantidades de ciclina B, apenas o suficiente para entrar na primeira fase M da meiose (LEDAN et al., 2001). Após o RVG, os níveis de ciclina B aumentam progressivamente, alcançando o máximo no final da primeira divisão meiótica, e se associa imediatamente com a quinase p34^{cdc2} para formar o complexo ativo (LEDAN et al., 2001). A degradação da ciclina B é requerida para a extrusão do corpúsculo polar. Logo, a atividade do MPF é regulada por um mecanismo que determina o nível da síntese de ciclina B.

Diferente da primeira divisão meiótica, a entrada na segunda meiose é semelhante à mitose: a atividade do MPF aumenta e o fuso é formado rapidamente. Os cromossomos da segunda meiose são idênticos aos cromossomos da mitose, compostos por duas cromátides irmãs com cinetócoros ativos. Entretanto, os oócitos permanecem em MII por um período prolongado até a fertilização, com os cinetócoros perfeitamente alinhados na placa metafásica e alta atividade do MPF. Este bloqueio meiótico é mantido pela atividade do fator citostático (CSF). A atividade do CSF requer a ativação da MAPK (VERLHAC et al., 1996). MAPK, que também pode ser chamada quinase regulada extracelularmente (ERK), é da família de proteínas quinases Ser/Thr que requerem dupla fosforilação nos resíduos serina e tirosina para tornarem-se completamente ativas. Duas isoformas das MAPKs, ERK1 e ERK2, são expressas no oócito de mamíferos e possuem um importante papel na meiose (SUN et al., 1999).

O momento da ativação da MAPK durante a maturação oocitária, assim como do MPF, varia entre espécies e diferentes modelos de maturação. FISSORE et al (1996) demonstraram que, em oócitos de bovinos, a ativação da MAPK e do MPF ocorre simultaneamente às 6h de cultivo, antes do RVG (que ocorre às 8h de cultivo). Em suínos, a atividade da MAPK é menor durante o estágio de VG, aumentando rapidamente em MI (INOUE et al., 1995).

Embora a atividade da MAPK não seja necessária para o RVG espontâneo em oócitos de mamíferos, existem evidências de que um aumento artificial na sua atividade pode acelerar essa etapa. Em oócitos de bovinos, injeção de RNAm para MOS (uma quinase que inicia a cascata de fosforilação da MAPK durante a maturação oocitária) acarreta uma rápida ativação da MAPK, resultando em uma retomada da meiose mais acelerada (FISSORE et al., 1996). Já em oócitos de suínos, no estágio de transição G2/M, a adição de MAPK ativa na VG acelera o RVG (INOUE et al., 1998). Esses resultados sugerem que em condições normais, a MAPK não está envolvida no início da ativação do MPF durante a retomada da

meiose, mas a ativação artificial da MAPK em oócitos de mamíferos prematuros pode levar a ativação do MPF e RVG por mecanismos ainda indefinidos (FAN e SUN, 2004).

2.3. Hormônios esteróides

Muitos esteróides possuem a capacidade de promover a maturação *in vitro* (SMITH e ECKER, 1971). Estudos envolvendo a identificação de receptores envolvidos na maturação oocitária têm sido realizados com a intenção de se compreender melhor este mecanismo. Inicialmente, evidências indicaram que esses receptores se encontravam na superfície celular (SMITH e TENNEY, 1980; LIU e PATINO, 1993; THOMAS et al., 2002). Também foi descoberto que esses receptores presentes na membrana também estão associados à sinalização em outros sistemas, como na ativação da MAPK e da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em células endoteliais e do cérebro (SHAUL, 2002; RAZANDI et al., 2002), e proteção da apoptose nas células ósseas (KOUSTENI et al., 2002). Em xenopus foi observada ação de receptores de progesterona na maturação oocitária, demonstrando que eles têm participação na maturação mediada pela progesterona (TIAN et al., 2000; BAYAA et al., 2000; BAGOWSKI et al., 2001).

Em bovinos, foi demonstrado que a adição de progesterona (P_4) no meio de maturação estimula a retomada da meiose em oócitos, tendo ou não a presença de hormônios gonadais (SIROTKIN, 1992) e a adição de 17β -estradiol (E_2) com FSH no meio aumentou a maturação em oócitos e desenvolvimento embrionário inicial (mórula e blastocisto) de bovinos (YOUNIS et al., 1989). Também foi observado, em oócitos de camundongos, que a testosterona e o estradiol foram capazes de suprimir o efeito inibitório da adição de 3-isobutil-1-metilxantina (substância que mantém os níveis de AMPc elevados) na maturação oocitária, permitindo que ocorresse o RVG e a ativação da MAPK, com uma resposta dose-dependente (GILL et al., 2004).

Um papel estabelecido do E_2 é o de promover a mudança na atividade do cálcio durante a maturação citoplasmática (TESARIK e MENDOZA, 1997), a qual está relacionada à oscilação de cálcio que ocorre durante a fertilização. Porém, foi observado que a suplementação com E_2 no meio de maturação livre de soro afetou negativamente a retomada da meiose e o subsequente desenvolvimento embrionário (BEKER et al., 2002).

MINGOTI et al. (2002) demonstraram que as células do *cumulus* de COC bovinos possuem a capacidade de secretar E_2 e P_4 em meio de cultura definido durante a maturação *in*

vitro. JAYAWARDANA et al. (2006) observaram que o E₂ juntamente com o FSH está envolvido na expressão do fator de diferenciação do crescimento-9 (GDF-9). O GDF-9 é um dos principais fatores secretados pelo oócito que está envolvido no processo de expansão das células do *cumulus* durante a maturação. WANG et al. (2006) demonstraram que a inibição da secreção dos esteróides pela adição de aminoglutatimida (AGT, um inibidor da cadeia de clivagem do colesterol) no meio de maturação preveniu a maturação e expansão das células do *cumulus* em oócitos bovinos, e que seu efeito inibitório não foi revertido pela adição de E₂ e P₄ nesse meio. Essas evidências mostram que os hormônios esteróides secretados pelo COC durante o cultivo têm efeito significativo na maturação oocitária *in vitro*.

2.4. Antioxidantes

Por definição, uma substância antioxidante é aquela capaz de inibir a oxidação ou, então, qualquer substância que, mesmo presente em baixa concentração, comparada ao seu substrato oxidável, diminui ou inibe a oxidação daquele substrato. Em condições normais, os antioxidantes convertem espécies reativas de oxigênio (ROS) em H₂O para prevenir um excesso na produção de ROS (AGARWAL et al., 2005). O desenvolvimento embrionário de mamíferos é negativamente afetado pelo aumento no estresse oxidativo que ocorre em condições de cultivo. Os danos oxidativos de compostos celulares causados por ROS interferem nas propriedades da função das células. A maioria das células possui um eficiente sistema antioxidante como catalase ou superóxido dismutase, assim como compostos tiol que atuam se ligando ativamente a ROS (DEL CORSO et al., 1994).

Sabe-se que a concentração de oxigênio encontrada no lúmen do trato reprodutivo feminino é cerca de um terço (3-9%) da encontrada em condições *in vitro* (MASTRIOANNI e JONES, 1965). Embriões cultivados sob uma alta tensão de oxigênio (20%) podem produzir mais radicais livres (FOWLER e CALLINGHAM, 2000) do que embriões cultivados sob 5 ou 7% de O₂ (LIU e FOOTE, 1995). Parece que o balanço entre a produção de ROS e sua ligação é um importante fator para a aquisição da habilidade de fertilização *in vitro* (DE LAMIRANDE et al., 1997). Isso mostra como os embriões cultivados *in vitro* são expostos ao estresse oxidativo no qual seus mecanismos de defesa são insuficientes para proteger sua delicada estrutura celular. Efeitos dos radicais livres derivados do oxigênio durante o cultivo *in vitro* (CIV) têm sido demonstrados em várias espécies. ROS podem induzir a disfunção mitocondrial, DNA, RNA e danos nas proteínas (COMPORTI, 1989), assim como inibir a fusão oócitos-espermatozóide (AITKEN et al., 1993). Para proteger os

oócitos e embriões do estresse oxidativo durante o CIV, vários antioxidantes podem ser adicionados ao meio de cultivo.

Os antioxidantes biológicos podem exibir dois modos distintos de ação contra os radicais livres (RL): o sistema primário, composto por inibidores preventivos que atuam impedindo a geração de espécies reativas ou o secundário, onde inibidores seqüestram estas espécies, impedindo sua interação com os alvos celulares. A inibição da formação é um processo que se dá em vias enzimáticas específicas, pelo qual se pode controlar a geração intensa de RL. A inativação de espécies já formadas é o processo mais usual, seja por catálise enzimática ou por combinação desta com os varredores exógenos. O pool de substâncias envolvidas na ação inativadora dos RL compõe, pois, um sofisticado aparato de proteção, sendo denominados antioxidantes (JORDÃO-Jr et al., 1998).

O sistema antioxidante é composto por vários componentes, dentre eles pode citar os antioxidantes não enzimáticos: glutathiona, ubiquinona, ácido úrico, bilirrubina, NDAPH e NADH, vitamina E, vitamina C, flavonóides, betacaroteno e licopeno; as proteínas ligadoras de metais: ceruloplasmina, metalotioneína, albumina, transferrina e mioglobina; e os antioxidantes enzimáticos. Enzimas antioxidantes são aquelas capazes de neutralizar ROS e prevenir danos na estrutura celular. As enzimas que compõem o sistema antioxidante são em número de três: a superóxido-dismutase (SOD), a catalase e a glutathiona-peroxidase (GPx) (JORDÃO-Jr et al., 1998).

2.4.1. Antioxidantes enzimáticos

Enzimas antioxidantes são aquelas capazes de neutralizar ROS e prevenir seus danos na estrutura celular. Elas são enzimas solúveis, isto é, não participam de sistemas membranários, nos quais as enzimas acham-se unidas de forma mais ou menos estável às membranas fosfolipídicas. Tais enzimas têm mobilidade tanto no citossol como na matriz semifluida das mitocôndrias, por exemplo. Elas são compostas pela superóxido dismutase, catalase, glutathiona peroxidase e glutathiona redutase, que reduzem o peróxido de hidrogênio para formar água. Em oócitos, a glutathiona oxidase/peroxidase tem sido a mais estudada (FURNOS et al., 2008; FUNAHASHI et al., 2008).

Os sistemas enzimáticos envolvem as enzimas do ciclo redox da glutathiona, particularmente a glutathiona peroxidase. Estudos demonstraram também que outras enzimas antioxidantes, como glutathiona redutase e glicose-6-fosfato-dehidrogenase, apresentaram

propriedades protetoras similares à glutathione peroxidase (SENTUERKER et al., 1997; WELLS et al., 1997).

A glutathione (GSH, L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine) é um tripeptídeo, contendo cisteína. É um tiol não protéico, encontrado em grande quantidade nas células dos mamíferos, e está presente no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular. Esse tiol possui um importante papel na detoxificação e antioxidação de compostos exógenos e endógenos, assim como na manutenção do estado redox intracelular. Ela é uma reserva natural de poder redutor, o qual pode ser rapidamente usado pelas células como defesa ao estresse oxidativo (MEISTER e ANDERSON, 1983).

O grupamento sulfidril (SH) da glutathione confere esta ação de proteção ao estresse oxidativo. A ação protetora da glutathione contra ROS é facilitada por sua interação com enzimas associadas, como a glutathione peroxidase e glutathione reductase. O núcleo do resíduo cisteinilglycine da glutathione está envolvido na sua função como antioxidante, mais especificamente como um redutor intracelular, sendo capaz, por exemplo, de reagir com um elétron não pareado de um radical livre, formando um radical GS \cdot , que produz, por dimerização, o GSSG (glutathione oxidada). O GSSG é, então, reduzido pela glutathione reductase, regenerando o GSH, em um processo à custa do NADPH (KRETZSCHMAR, 1996). A glutathione reductase, que regenera o GSH tem o NADPH como substrato (KRETZSCHMAR, 1996). A disponibilidade limitada do NADPH pode levar a um aumento do GSSG e deixar as células mais sensíveis ao dano oxidativo (SHAN et al., 1990). Outra atividade de proteção do GSH é na regeneração da vitamina E oxidada, no processo de detoxificação.

A glutathione (GSH) atua de maneira importante na proteção celular contra mudanças no quadro oxidativo e na defesa contra xenobióticos. Entre as funções do GSH, na proteção contra a peroxidação lipídica, podem ocorrer três reações. Primeiro, o GSH é usado como substrato pela glutathione peroxidase, na eliminação de peróxidos. Segundo, o GSH reduz a forma oxidada da vitamina C, que assim pode atuar, mantendo a vitamina E na sua forma reduzida e funcional. Finalmente, o GSH pode, através da glutathione-S-transferase, detoxificar aldeídos reativos (como o malondialdeído) que são gerados durante a peroxidação lipídica. Se, de fato, grande parte da ação do GSH é obtida pela indução de suas enzimas, é necessária a manutenção do nível de GSH para suportar a ação funcional destas enzimas (JONES et al., 1995). Variações na concentração de glutathione afetam diretamente a síntese

de proteínas e de DNA. Oxidação ou depleção da GSH pode diminuir a síntese protéica. O GSH pode ser perdido de modo irreversível em situações de estresse oxidativo muito intenso, permanecendo na forma oxidada e não sendo novamente reduzido (UHLIG e WENDEL 1992).

Nos tecidos animais, a glutathione peroxidase, uma enzima antioxidante que contém selênio, catalisa a redução do peróxido de hidrogênio, (e peróxido de lipídio) na presença da GSH, a qual é convertida em GSSG (LUBERDA, 2005). Este é um importante sistema de defesa enzimático contra o aumento de radicais livres (MANNERVIK, 1985). Já foram reportadas as determinações dos principais parâmetros cinéticos de GSH-Px, propondo mecanismos catalíticos de funcionamento desta enzima envolvendo seus principais substratos, glutathione e peróxido de hidrogênio (CARSOL et al., 1996; LEHMAN et al., 1998). Quatro diferentes tipos de glutathione peroxidases são conhecidos, dentre as quais a fosfolipídeo hidroperóxido glutathione peroxidase (PHGSH-Px) também consegue promover a redução de hidroperóxidos a partir de complexos lipídicos como colesterol, mesmo quando os peróxidos estão presentes na membrana celular (LEHMAN et al., 1998)

A atividade enzimática de GSH-Px é um dos meios de controle do organismo dos níveis de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, oriundos do ataque de espécies radicalares (MEISTER e ANDERSON, 1982; COHEN e HOCHSTEIN 1963). A enzima glutathione peroxidase possui uma característica importante, apresentando um resíduo de cisteína contendo selênio covalentemente ligado ao restante da enzima.

Outra enzima que age conjuntamente com a glutathione peroxidase é a enzima glutathione reductase (GR) (MEISTER e ANDERSON, 1982). Esta enzima não age diretamente na remoção de espécies radicalares, porém é responsável pela regeneração da glutathione à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathione.

A GSH é um antioxidante natural presente em ambos os gametas, em concentrações variadas, e nas células somáticas. Foi demonstrado que a glutathione possui um importante papel na maturação oocitária. A síntese intracelular de glutathione é parte fundamental na maturação citoplasmática do oócito (EPPIG, 1996). Sugere-se que concentrações intracelulares de GSH de oócitos de suínos no estágio final da maturação *in vitro* refletem o grau de maturação citoplasmática (FUNAHASHI et al., 1994). Muitos autores postularam que a mensuração da concentração de GSH em oócitos após a MIV pode ser um válido indicador da maturação citoplasmática (DE MATOS et al., 1997; ABEYDEERA et al., 1998; DE MATOS e FURNUS, 2000). Um aumento nas concentrações intracelulares de GSH

aumenta a produção *in vitro* de embriões suínos (WHITAKER e KNIGHT, 2004) e a maturação *in vitro* de oócitos de búfalo (GASPARRINI et al., 2006). Em bovinos já foi demonstrado que uma alteração na concentração de GSH no oócito e células do *cumulus* durante a maturação *in vitro*, altera o desenvolvimento embrionário (FURNOS et al., 2008).

As concentrações de GSH em oócitos maturados *in vivo* são muito mais elevadas quando comparadas com as observadas em oócitos maturados *in vitro*. Uma possível razão para esta diferença pode ser que durante a MIV, os oócitos são expostos à alta concentração de oxigênio e, conseqüentemente, a ROS, em comparação a oócitos maturados *in vivo*. Isto ocorre porque a concentração de oxigênio no lúmen do trato reprodutivo é cerca de um terço a menos que na MIV. BRAD et al (2003) demonstraram que em oócitos durante a MIV, a mobilização de GSH intracelular para proteger a célula contra o estresse oxidativo pode resultar em um grande declínio em seus níveis, o qual é menor do que no observado em oócitos maturados *in vivo*.

Baixa concentração intracelular de GSH pode ser responsável, em parte, por um baixo desenvolvimento da competência de oócitos suínos durante a MIV (BRAD et al., 2003). Entretanto, uma menor tensão de oxigênio durante a MIV de oócitos bovinos é acompanhada pela redução de concentrações de H_2O_2 nessas células, a qual é benéfica para o desenvolvimento da competência, provavelmente pela diminuição de ROS (HASHIMOTO et al., 2000). Evidências têm sugerido que a GSH está ativa na maturação oocitária, incluindo durante a manutenção da morfologia do fuso meiótico. Ela protege o fuso de danos oxidativos e, conseqüentemente, assegura a formação de um zigoto normal (ZUELKE, et al., 1997).

A concentração da glutathiona também é diferenciada no oócito pela fase em que ele se encontra do ciclo celular. Ela aumenta durante a MIV e alcança um nível máximo no estágio MII. Geralmente, as concentrações de GSH em um oócito ovulado são aproximadamente duas vezes maiores do que em um oócito no estágio de VG (imaturo) (ZUELKE et al., 2003). Esta elevada concentração em oócitos ovulados pode servir como uma reserva deste antioxidante para o desenvolvimento embrionário e a pré-implantação (DE MATOS e FURNUS, 2000). Foi demonstrado que em condições fisiológicas, o alto nível de GSH em oócitos maduros de hamster e camundogos é essencial para formar o pronúcleo masculino após a fertilização e promover o desenvolvimento embrionário (GARDINER e REED 1994; ZUELKE et al., 2003). Esses dados mostram que a GSH é um indicador bioquímico da integridade e capacidade de desenvolvimento dos oócitos de mamíferos.

2.5. Óxido nítrico (NO)

O ovário é um órgão endócrino complexo que sofre mudanças estruturais e funcionais durante o ciclo estral. O mecanismo de controle dessas mudanças pode envolver muitos fatores que são produzidos dentro ou fora do ovário. Um desses fatores reguladores é o NO, o qual possui um importante papel em muitos processos fisiológicos ovarianos. (RETTORI e McCANN, 1998).

O NO é um radical livre altamente reativo com uma meia-vida curta. Ele é rapidamente oxidado para nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), dois produtos estáveis do metabolismo do NO (NORMAN e CAMERON, 1996). Em mamíferos, o NO é sintetizado pela óxido nítrico sintase (NOS), uma enzima que converte L-arginina em L-citrulina e NO, na presença de oxigênio e vários co-fatores como Ca_2^+ /calmodulina, tetrahydrobiopterina, dinucleotídeo adenina flavina, mononucleotídeo flavina e dinucleotídeo nicotinamida adenina fosfato (RETTORI e McCANN, 1998). A NOS ocorre em duas isoformas funcionais, a NOS constitutiva (cNOS) e a NOS induzível (iNOS) (SESSA, 1994). Elas podem ser distinguidas por sua sensibilidade ao cálcio: a cNOS é Ca_2^+ /calmodulina dependente e a iNOS é Ca_2^+ /calmodulina independente. GHAFOURIFAR e RICHTER (1997) e GIULIVI et al. (1998) descreveram a produção mitocondrial de NO por uma isoforma especializada, a óxido nítrico sintase mitocondrial (mtNOS) (ELFERING et al., 2002). Ela possui ação clássica como NOS, precisando de NADPH, arginina, O_2 e Ca^{++} /calmodulina para sua atividade enzimática (TATOYAN e GIULIVI, 1998; BOVERIS et al., 2002) e regula a respiração celular (LOPEZ-FIGUEROA et al., 2000).

Existem duas grandes diferenças entre as isoformas, a duração da produção de NO e o local que o NO pode ser produzido. A dependência de calmodulina é limitante para as enzimas constitutivas, pois o fluxo de cálcio irá regular sua atividade, promovendo um curto período de produção do NO. Ao contrário, a iNOS, que tem a calmodulina como subunidade, é permanentemente ativada e capaz de gerar NO por períodos prolongados (THOMAS et al., 2008).

Resultados contraditórios foram observados na participação do NO nas respostas patofisiológicas (IGNARRO, 1996). Enquanto parte dos estudos mostrava que o NO era tóxico, outros mostravam que ele protegia (WINK et al., 1996; GRISHAM et al., 1999). A ação tóxica do NO foi atribuída à formação de espécies reativas de nitrogênio (ERN) que mediavam a morte celular, enquanto o efeito protetor foi proposto ocorrer por um mecanismo antioxidante (WINK et al., 1998).

O NO pode ter suas reações divididas em duas categorias: direta e indireta. Os efeitos diretos são as reações que ocorrem rápido o suficiente para que o NO reaja diretamente com a molécula alvo. Em contrapartida, os efeitos indiretos requerem que o NO reaja com o oxigênio ou superóxido para gerar ERN, o qual subsequente reagia com as moléculas alvo. Os efeitos diretos normalmente ocorrem quando o NO se encontra em baixa concentração, enquanto que os indiretos ocorrem em alta concentração (WINK et al., 1996).

Em baixas concentrações o NO pode também se ligar à citocromo oxidase, resultando na inibição reversível do transporte de elétrons mitocondrial (BROWN, 1997). Neste caso, parece que o NO tem uma interação competitiva com o oxigênio molecular. Já sua ligação no grupo heme da catalase pode resultar na inibição reversível ou irreversível desta enzima. A inibição reversível da catalase parece estar associada à ligação reversível do NO ao grupo heme da enzima (BROWN, 1995). Em contraste, quando se observa a inibição irreversível, ocorre inibição do composto II da catalase (MOHAZZAB et al., 1996).

A biologia química do NO permite entender como essa simples molécula pode ter numerosas propriedades biológicas baseadas simplesmente na sua concentração. Baixa concentração de NO, que ocorre em células vasculares e no estroma (produzidas pela eNOS e nNOS), regulam processos fisiológicos normais, e alta concentração, observada em macrófagos ativados (via iNOS) possuem funções citotóxicas/citostáticas (KNOWLES e MONCADA, 1994; IGNARRO, 1996).

Estudos indicaram que a eNOS e/ou iNOS estão presentes no oócito, embriões em desenvolvimento inicial e no útero de camundongos, sugerindo que o NO possui um papel regulador na maturação meiótica, no desenvolvimento embrionário e na implantação (GOUGE *et al.*, 1998; PURCELL *et al.*, 1999). Já foi identificada sua ação na maturação de oócitos de ratos (BU et al., 2002, 2003), suínos (TAO et al., 2004) e bovinos (VIANA et al., 2007; MATTA et al., 2009).

Várias pesquisas indicam que o NO inibe (NAKAMURA *et al.*, 2002; VIANA et al., 2007; MATTA *et al.*, 2009) e/ou estimula, (SENGOKU *et al.*, 2001; BLASHKIV *et al.*, 2001; VIANA et al., 2007) a maturação meiótica, dependendo de sua concentração. Em concentrações fisiológicas, o NO é essencial para a maturação meiótica, e pode estar envolvido no processo que determina a qualidade do oócito e seu potencial no desenvolvimento embrionário (JABLONKA-SHARIFF e OLSON, 1998; SENGOKU et al., 2001). Tem sido sugerido que ele participa na prevenção da atresia e apoptose de folículos em desenvolvimento (CHUN et al., 1996).

Um mecanismo pelo qual o NO pode participar na maturação oocitária envolve a regulação da síntese de nucleotídeos cíclicos. O NO é conhecido como regulador da guanilato ciclase e estimula a produção de GMP cíclico (GMPc) em células alvo (NATHAN, 1992). Nucleotídeos cíclicos sintetizados pelas células do *cumulus* têm sido reconhecidos como importantes moduladores da maturação oocitária (SATO e KOIDE, 1987; TORNELL *et al.*, 1991). O GMPc tem sido localizado nas células da granulosa de ovários de ratas e está envolvido na retomada da meiose em oócitos de ratas e hamsters (TORNELL *et al.*, 1991). Sua influência na sinalização celular é através da ativação ou inibição de fosfodiesterases (PDE).

Existem 11 famílias conhecidas da PDE, e a atividade da PDE classe 3, expressa no oócito, é inibida pelo GMPc (CONTI *et al.*, 1995). Em sistemas celulares onde AMPc e GMPc atuam sinergicamente, a PDE3 é inibida pelo NO e pelo GMPc, resultando no aumento da concentração de AMPc, impedindo a retomada da meiose (KURTZ *et al.*, 1998). O NO também pode atuar inibindo a atividade da MAPK pela produção de GMPc (INGRAM *et al.*, 2000). JABLONKA-SHARIFF *et al.* (1999) demonstraram que o NO pode ser requerido para eventos estruturais que ocorrem durante a meiose, incluindo a reorganização dos microtúbulos.

Tem sido utilizada a adição de um doador de NO no meio de maturação para avaliar o comportamento do oócito em diferentes concentrações de NO. SENGOKU *et al.* (2001) demonstraram que na presença de baixa concentração de nitroprussiato de sódio (SNP - 10^{-7} M), mas não de altas (10^{-5} e 10^{-3} M), ocorre um aumento na porcentagem de maturação em oócitos de ratas. NAKAMURA *et al.* (2002) observaram que a adição de s-nitroso-n-acetil-l,l-penicillamina (SNAP) em uma concentração de 500 μ M preveniu o rompimento da vesícula germinativa induzido pela administração do hCG, sugerindo que o NO pode estar envolvido na manutenção da parada da meiose. Elevada concentração de SNP pode também suprimir a maturação espontânea em oócitos de fêmeas de camundongos (BU *et al.*, 2003). Estes dados sugerem que a concentração intracelular de NO possui um papel crítico na sobrevivência e função celular.

O SNP é um complexo metal nitrosil composto por ferro, grupos cianídros e um nitro moiety [$\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}$] com peso molecular de 298. Foi descoberto que é sensível à luz e quando exposto a ela poderá sofrer mudança eletrônica na sua estrutura. Esta substância tem a habilidade de liberar NO. O mecanismo pelo qual o SNP gera NO ainda está sendo investigado, mas acredita-se que a decomposição fotolítica pode possuir um papel chave nesta reação. As condições ambientais poderão determinar o nível do produto final. Se as

condições são a favor da re-oxidação, então os intermediários reformarão o SNP (KRAGER, 2003).

MATTA et al. (2002) demonstraram que a adição do inibidor da síntese de NO (L-NAME, 10^{-7} , 10^{-5} e 10^{-3} mM) não inibe a meiose de oócitos bovinos. Neste mesmo estudo foi observado que a maturação citoplasmática foi mais sensível do que a nuclear quando existiam concentrações reduzidas de NO no meio de maturação e que o NO estava envolvido na regulação da concentração de proteínas que podem estar envolvidas na regulação do desenvolvimento embrionário inicial, visto que a taxa de blastocistos diminuiu quando a concentração de NO_3^- e NO_2^- diminuiu.

O NO é o melhor exemplo de molécula reativa que demonstra tanto propriedade citotóxicas como citoprotetoras (WINK et al., 1998), e não necessita de um receptor específico, nem de um canal protéico, estando livre para transitar e atuar em diversos sítios. Devido a tais características, é uma molécula adequada para atuar como sinalizador intracelular e entre células vizinhas (STRYER, 1996; CAMPBELL, 2000).

A reação direta do NO com radicais oxigenados pode ser um mecanismo citoprotetor que será mais efetivo em situações que possuam um componente de propagação no mecanismo da reação, assim como na peroxidação lipídica. O papel da sinalização do NO também é importante para manter uma vascularização saudável e inibir a progressão de doenças inflamatórias, como a arteriosclerose. O clássico caminho de sinalização do NO, a ativação da guanilato ciclase solúvel e conseqüente formação de GMPc, ocorre na musculatura lisa dos vasos, representando importante ação vaso-relaxante e mecanismos anti-trombóticos (MONCADA et al., 1991). Porém, tem se indicado que diferentes sinalizações do NO, independentes do GMPc, também são capazes de regular eventos transcricionais que controlam a expressão e síntese de enzimas antioxidantes (FORESTI et al., 1997; LI et al., 1999; FRANK et al., 1999).

O óxido nítrico possui propriedades antioxidantes por sua reação com o O_2^- (WINK et al., 2001). Ele previne a ação redutiva do O_2^- e inibe a formação do H_2O_2 . Uma relação vista foi que o O_2^- e H_2O_2 possuem efeito na sinalização do NO (BRUNE, 2005). A reação direta do NO com intermediários dos radicais alkoil e peroxil durante a peroxidação lipídica, impede a propagação dos radicais lipídicos nas reações em cadeia (RUBBO et al., 1994). Ele também limita a injúria de moléculas alvo ou tecidos durante eventos associados com o excesso de produção de espécies reativas de oxigênio. Isso inclui a inibição da morte oxidativa (WINK et al., 1993), diminuição da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (GRAHAM et al., 1993; HOGG et al., 1993) e modulação (KUROSE et al., 1994) e redução

da injúria por isquemia (PAYNE e KUBES, 1993). Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) está relacionado à oxidação de diferentes moléculas biológicas que pode resultar em dano tecidual (WINK et al., 1993). O NO não reage diretamente com o OH, mas é capaz de proteger as células contra a toxicidade causada por ele (WINK e MITCHELL, 1998).

Um dos antioxidantes mais importantes na célula é a glutathiona (GSH). Em situações de estresse oxidativo agudo mediado pelo NO na ativação da iNOS, ocorre a indução da síntese de GSH para manter níveis adequados de antioxidantes, desde que a inibição da atividade da NOS cause uma queda precipitada nos níveis de GSH (KUO et al., 1996). Em condições fisiológicas, células endoteliais e da musculatura lisa dos vasos, expostas baixos fluxos de NO são estimuladas a sintetizar GSH adicional (MOELLERING et al., 1999). O primeiro passo para a síntese da GSH, é a formação da γ -glutamilcisteína pela γ -glutamylcisteína sintetase, que é uma etapa limitante da síntese. A atividade da γ -glutamylcisteína sintetase é modulada por substâncias pro-oxidantes (como H_2O_2) e por mecanismos monoxidativos que relacionam a densidade celular e a integridade do glutamato. No passo final da biosíntese da GSH, glicina é incorporada pela GSH sintase. A cisteína e metionina também são de grande importância no controle dos níveis de GSH. O NO atua na regulação da transcrição da γ -glutamylcisteína sintetase e na liberação da cisteína, participando assim do controle da síntese de glutathiona (DENEKE e FANBURG, 1989).

3. Alterações morfológicas durante a maturação

3.1. Citoesqueleto

Microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários são os três principais sistemas do citoesqueleto de células de vertebrados e muitos invertebrados. Durante a maturação meiótica, os oócitos passam por duas divisões meióticas que consistem de eventos celulares que são controlados pelo citoesqueleto do oócito. Microtúbulos formam o fuso que separa os cromossomos homólogos durante a primeira divisão meiótica e as cromátides irmãs durante a segunda divisão. O fuso de microtúbulos e os filamentos de actina controlam a separação assimétrica dessas divisões meióticas (BRUNET e MARO, 2005).

Essas divisões produzem uma pequena célula, chamada corpúsculo polar, e o oócito, o qual mantém seu tamanho original. Ambas as divisões do oócito são assimétricas. Essa assimetria é garantida pelo posicionamento do fuso na periferia do oócito. O fuso em

metáfase I (MI) normalmente é formado no centro do oócito e migra em direção à periferia (LONGO e CHEN, 1985; MARO e VERLHAC, 2002). O primeiro corpúsculo polar é eliminado após essa migração. Já o fuso da MII é formado na periferia do oócito e é mantido próximo à membrana plasmática durante o segundo bloqueio metafásico. Após a fertilização ou ativação, se inicia a rotação do fuso e ocorre a extrusão do segundo corpúsculo polar (MARO e VERLHAC, 2002).

Em oócitos de rato, a migração do fuso e seu ancoramento requerem filamentos de actina e não microtúbulos (LONGO e CHEN 1985; MARO e VERLHAC, 2002). Essa posição excêntrica do fuso está associada à reorganização local do córtex oocitário. Esse domínio cortical aparece durante a migração do fuso e é mantido durante a MII. Essa reorganização é marcada pela perda local das microvilosidades (JOHNSON et al., 1975), acúmulo de filamentos de actina sob a membrana plasmática (MARO et al., 1984; LONGO e CHEN 1985) e migração dos grânulos corticais. A função desse processo é independente do núcleo. (DENG et al., 2005).

A interação direta entre cromossomos e actina controla a posição do fuso. Porém, os cromossomos controlam a reorganização cortical da actina por um efeito a distancia. Também tem se observado que os cromossomos exercem um papel na organização dos microtúbulos. A cromatina intervém na interação física entre cromossomos e fuso de microtúbulos, ou seja, os cromossomos controlam, próximos a ele, a ativação de fatores requeridos para a formação do fuso (KALAB et al., 2002; ZHENG, 2004). Com base nessas observações pode-se então sugerir que em oócitos de mamíferos os cromossomos funcionam como controle territorial, organizando ambos os microtúbulos e os filamentos de actina no citoplasma oocitário (BRUNET e MARO, 2005). Esse controle é essencial para alcançar a divisão assimétrica que leva a formação de um gameta funcional.

Antes do início da meiose, quando os oócitos se encontram no estágio de vesícula germinativa (VG), os filamentos de actina estão distribuídos uniformemente ao redor do córtex e também próximos à VG. Após o rompimento da VG (RVG), os microfilamentos se encontram presentes tanto no córtex como ao redor da cromatina (KIM et al., 1998; WANG et al., 2000). Em oócitos maduros, o fuso é localizado periféricamente abaixo da capa de actina (LONGO e CHEN, 1985). O RVG e a formação do fuso meiótico não são controlados pelos microfilamentos, mas o movimento polarizado dos cromossomos depende de processos mediados por microfilamentos durante a maturação de oócitos de ratos (SUN e SCHATTEN,

2006). Parece que os microfilamentos são necessários para as funções dos microtúbulos e que a segregação dos cromossomos homólogos requer interação entre ambos.

A maturação meiótica em oócitos de mamíferos é um processo complexo que envolve rearranjo dos microtúbulos e dos filamentos de actina (ROTH e HANSEN, 2005), assim como de outras proteínas associadas ao citoesqueleto. Actina é uma proteína abundante que possui um importante papel no processo de migração celular. Tem sido bem estabelecido que células eucarióticas requeiram filamentos de actina para manter seu formato e para migração, crescimento, polarização, movimento de organelas, endocitose/exocitose, replicação e regulação genética. PARD6A é um membro da família PAR (AHRINGER, 2003) que pode estar envolvido na conexão entre os cromossomos e a ação da actina. Durante a MI, PARD6A está concentrada no meio do fuso que induz à migração. Após a despolarização dos microtúbulos, ela se concentra na superfície dos cromossomos orientando-os em direção ao córtex. Isto pode ser parte de um complexo multi-proteico ligado a cromossomos, microtúbulos e microfilamentos de actina que dão suporte a motilidade e ancoramento do fuso (VINOT et al., 2004).

No início da MI, logo após o rompimento da vesícula germinativa (RGV), os centros organizadores de microtúbulos (MTOCs) são ativados e recrutados ao redor dos cromossomos e os microtúbulos são preferencialmente estabilizados nessa área (BRUNET et al., 1998). Porém, os cromossomos são necessários para restringir a atividade dos MTOCs e a organização dos microtúbulos. Esta restrição é crucial para formar apenas um fuso no oócito. O crescimento desordenado dos microtúbulos é então progressivamente organizado em uma ordem bipolar ao redor dos cromossomos. Isso indica que os cromossomos estão envolvidos no controle do tamanho do fuso, por meio do local de ativação dos fatores que estabilizam os microtúbulos (BRUNET et al., 1998).

IBÁÑEZ et al (2005) observaram que a morfologia do fuso se forma de maneira diferente em oócitos de camundongos cultivados *in vivo* ou *in vitro*, demonstrando que alguns aspectos no processo de formação morfológica do fuso podem ser suscetíveis à condição de cultivo.

Uma vez alcançada a formação do fuso bipolar, os cromossomos se alinham no fuso equatorial e formam uma placa metafásica. Durante a mitose, esse alinhamento é monitorado pelos cinetócoros, estruturas associadas com os centrossomos de ambas as cromátides irmãs. A captura dos cinetócoros estabiliza os microtúbulos e forma uma robusta fibra de cinetócoros (fibras-k). Quando as fibras-k se conectam a ambos os cinetócoros de um

cromossomo, o cromossomo é transportado para o equador do fuso (BIGGINS e WALCZAK, 2003).

Em oócitos de camundongos, durante a primeira fase M meiótica, cromossomos bivalentes se alinham na placa metafásica por um mecanismo diferente. Durante um período dessa fase, os cinetócoros não são capazes de se ancorar nos microtúbulos. Após a pró-metáfase, a ativação dos cinetócoros permite a formação das fibras-k, levando ao alinhamento dos cromossomos na placa metafásica (BRUNET et al., 1999). Componentes moleculares dos cinetócoros estão presentes no cinetócoro logo após o RVG. Isto sugere que a maturação do cinetócoro não é regulada pelo recrutamento de seus componentes, mas sim pelas modificações de alguns de seus fatores. A duração da MI é determinada pela cinética da atividade do fator promotor da maturação (MPF). Um alto nível de MPF ativo, alcançado no final da MI, poderia induzir modificações nos componentes dos cinetócoros, levando a formação das fibras-k.

Durante a MI, a formação funcional do fuso é um processo lento. Essa cinética está relacionada ao progressivo aumento na atividade do MPF (POLANSKI et al., 1998). A atividade de MPF requerida para o RVG leva apenas a formação de uma única aste de microtúbulo ao redor dos cromossomos condensados. Um primeiro ponto na atividade do MPF é então requerido para organizar os microtúbulos em uma estrutura bipolar (Figura 1). Um segundo ponto é requerido no final de MI para ativar os cinetócoros (BRUNET et al., 1999) e permitir a captura dos microtúbulos pelos cinetócoros e a futura formação das fibras-k. Esses dados mostram que a atividade do MPF controla a formação de um fuso funcional no oócito. Ele também possui um controle indireto na posição do fuso, pois com a ativação dos cinetócoros a migração do fuso só é iniciada após a ativação do MPF em nível elevado. Sendo assim, o MPF pode estar controlando a atividade de proteínas associadas aos microfilamentos (SATTERWHITE et al., 1992) e induzindo a migração do fuso.

O complexo promotor da anáfase (APC/C) é requerido para o início da anáfase e saída da mitose (TAYLOR et al., 2004). Ele também é requerido para a progressão da meiose e para ativar a formação do fuso em oócitos de camundongos (BRUNET et al., 2003). Tem sido sugerido que o APC/C está inativado durante grande parte da fase M meiótica, sendo que sua ativação só ocorre quando a atividade do MPF chega ao segundo ponto, também requerido para a ativação dos cinetócoros (BRUNET et al., 1999).

A concentração de ciclina B, durante a regulação da atividade do MPF, sincroniza diferentes eventos que levam a formação do corpúsculo polar, tais como formação das fibras-

k (requeridas para o alinhamento final dos cromossomos na placa metafásica), ativação do APC/C (requerida para a separação dos cromossomos e saída da primeira fase M meiótica) e migração do fuso (requerida para a divisão assimétrica) (BRUNET e MARO 2005).

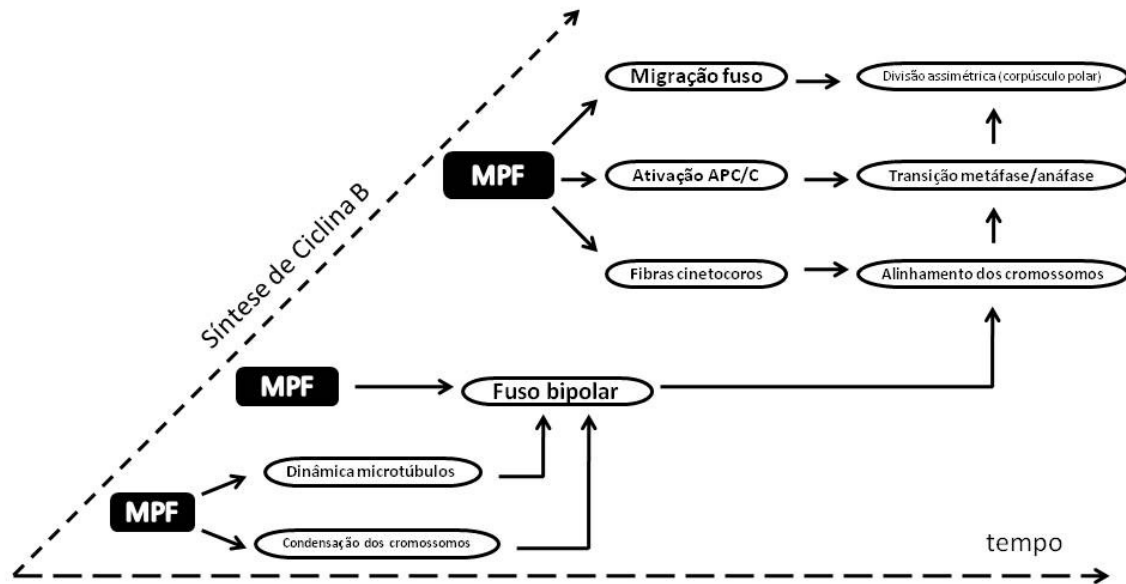


Figura 1: Síntese de ciclina B controla o tempo de maturação meiótica pela ação do MPF (Adaptado de: BRUNET e MARO, 2005)

Ao contrário da primeira, a entrada na segunda divisão meiótica é semelhante à mitose, ou seja, a atividade do MPF aumenta rapidamente e o fuso é formado. Os cromossomos são compostos por cromátides irmãs com cinetócoros ativos. Entretanto, os oócitos permanecem na metáfase por muitas horas até o momento da fertilização, com os cromossomos perfeitamente alinhados na placa metafásica e com alta atividade do MPF. Esse bloqueio metafásico é mantido pela atividade do fator citostático (CSF; MASUI e MARKERT, 1971). Mecanismos e componentes específicos são requeridos para manter uma estrutura estável. Dois substratos da MAP kinase, o MISS (proteína estabilizadora do fuso e associada à MAPK) e o DOC1R estão associados com o fuso em oócitos bloqueados em MII (LEFEBVRE et al., 2002; TERRET et al., 2003). O DOC1R se acumula durante a maturação meiótica enquanto o MISS só está presente durante a MII. Em oócitos com alteração na atividade desses substratos, o fuso em MII se forma normalmente, mas se torna desorganizado, após um período, indicando que existe um papel, de ambas as proteínas, durante o bloqueio em MII.

A correta posição e o movimento ativo das organelas são essenciais para o crescimento, maturação e fertilização do oócito. Durante o crescimento de oócitos de mamíferos, as organelas se movem para o córtex da célula, formando uma “área de organelas”. Diferentemente, durante a maturação, as organelas se movem centralmente (menos os grânulos corticais), formando uma “área livre de organelas” no córtex do oócito maduro. As mitocôndrias se acumulam na área perinuclear durante a progressão meiótica (RVG para AI). Mais tarde, são formados grupos de mitocôndrias que se movem para o interior do citoplasma em oócitos maduros. Este movimento mitocondrial é mediado pelos microtúbulos, e não pelos microfilamentos (SUN et al., 2001). O controle do movimento de outras organelas não está bem documentado em oócitos. Foi demonstrado que os microfilamentos regulam a separação dos centrossomos, mas não seu movimento no ooplasma (CALARCO, 2005).

Filamentos de actina que estão associados à membrana plasmática são importantes para gerar uma área na superfície celular especializada e também promover um direcionamento para a força remodeladora da estrutura celular. O córtex de oócitos de ratos possui numerosos filamentos de actina que surgem da membrana plasmática, formando uma camada uniforme de microfilamentos. O local de ancoramento dos filamentos na membrana plasmática é marcado por material eletrôn-denso logo abaixo da membrana. Durante a maturação meiótica, a distribuição cortical da actina é alterada (LONGO, 1987). Uma camada uniforme relativamente densa de actina também é observada no córtex de oócitos de suínos, bovinos e humanos (KIM et al., 1998, 2000; PICKERING et al., 1998; SUN et al., 2001).

As células animais utilizam um anel contrátil que está associado com a membrana plasmática para criar uma linha de clivagem que partirá a célula em duas células filhas. Este anel contrátil é formado por uma rede de filamentos de actina e miosina, e a atividade motora da miosina dirige essa constrição (GLOTZER, 2005). Evidências sugerem que durante a meiose os oócitos adotam mecanismos similares tanto para liberação do primeiro quanto para a liberação do segundo corpúsculo polar durante a maturação e fertilização. Em oócitos de humanos no estágio de telófase, foi demonstrada a presença de um anel contrátil na linha de clivagem entre o oócito e o segundo corpúsculo polar (PICKERING et al., 1998). Quando os filamentos de actina são inibidos, a extrusão do corpúsculo polar é bloqueada em ratos (MARO et al., 1984), camundongos (TERADA et al., 1995) e ovelhas (LE GUEN et al., 1989).

3.2. Grânulos corticais

Em oócitos de mamíferos, a poliespermia induz a um desequilíbrio genético e resulta na morte embrionária inicial. Grânulos corticais (GC) são organelas derivadas do aparato de Golgi, que são originadas dentro dos oócitos durante o início do crescimento folicular (CRAN e ESPER, 1990). Essas organelas, em mamíferos, medem 0,2-0,6 μm de diâmetro e estão situadas no córtex de oócitos em MII. São possuidoras de uma população de moléculas que incluem proteases, glicosidases, enzimas e proteínas estruturais (WESSEL et al., 2001).

GC são vesículas secretoras que possuem um papel fundamental na prevenção a poliespermia após a fertilização. Eles podem ser identificados em pequenos grupos pelo citoplasma dos oócitos quando se encontram no estágio de VG. Logo após o RVG, os GC se ligam aos microfilamentos e migram para a região cortical celular. Quando os oócitos atingem o estágio de MII, os GC estão distribuídos no córtex próximo à membrana plasmática formando uma compacta monocamada (WESSEL et al., 2001; VELILLA et al., 2004). O MPF estimula esta associação entre os GC e microfilamentos (WESSEL et al., 2002). Esse processo de migração dos GC dirigido pelos microfilamentos já foi identificado em ratos (CONNORS et al., 1998) e suínos (SUN et al., 2001). Porém, o ancoramento dessas vesículas é independente tanto dos microfilamentos quanto dos microtúbulos (CONNORS et al., 1998; SUN et al., 2001).

Após a fusão dos gametas, os GC se fundem com o oolema e liberam seu conteúdo no espaço peri-vitelínico, em um evento conhecido como reação cortical (BRADEN *et al.*, 1954). Supõe-se que o conteúdo liberado pelos GC no espaço peri-vitelínico é responsável por estabelecer um bloqueio a poliespermia por meio da mudança da constituição da zona pelúcida e de muitas funções do oolema (CHERR e DUCIBELLA, 1990). Também é possível que o conteúdo dos GC possua um papel na pré-implantação embrionária, promovendo um microambiente satisfatório no espaço peri-vitelínico, aumentando assim a habilidade de proteção do embrião (SCHMELL e GULYAS, 1980).

4. Apoptose

Apoptose, ou morte celular programada, é um processo que elimina células comprometidas superficialmente ou geneticamente. Este processo envolve uma série de

caminhos metabólicos que levam a mudanças na célula orientando-a para a morte programada, sendo assim de grande importância no funcionamento normal de todos os tecidos. A apoptose tem sido reconhecida como um fator determinante no controle da proliferação de células anormais e na manutenção da homeostase que controla o número de células durante o desenvolvimento e proliferação (BOSCO et al., 2005).

O processo de apoptose elimina células com o DNA danificado irreversivelmente. Este processo é utilizado pelo organismo durante o desenvolvimento e se mantém mesmo após esse período (ELLIS et al., 1991).

Em tecidos, as características estruturais causadas pela apoptose incluem: condensação da cromatina nuclear, fragmentação da célula e produção dos corpos apoptóticos e fagocitose dos corpos apoptóticos pelos macrófagos. Já os aspectos histológicos incluem: vacuolização do citoplasma, condensação da cromatina e aparecimento de corpos apoptóticos eosinofílicos ao redor da massa citoplasmática. Bioquimicamente ela é caracterizada por uma rápida fragmentação do DNA (WYLLIE, 1993). A apoptose é acompanhada pela redução do volume celular (picnose), condensação da cromatina, fragmentação nuclear, pouca ou nenhuma alteração estrutural das organelas citoplasmáticas, protuberância da membrana plasmática (mantendo sua integridade até o estágio final do processo), alterações na assimetria de fosfolípidos da membrana plasmática e engolfamento pelos fagócitos (*in vivo*) (KROEMER et al., 2009).

As mudanças celulares envolvidas no processo apoptótico incluem a perda da assimetria dos fosfolípidos durante os estágios iniciais. Em células vivas, fosfatidilserina é transportada para o interior da bicamada lipídica pela enzima aminofosfolípido translocase dependente de Mg ATP (KUYPERS et al., 1996). No início da apoptose, a fosfatidilserina é translocada para a porção externa da membrana. Anexinas são proteínas homologas de ubiquitina que se ligam a fosfolípidos na presença de cálcio (PIGAULT et al., 1994). Então, o movimento da fosfatidilserina da superfície interna da membrana para a externa é um indicativo da apoptose, sendo então a anexina V conjugada a fosfatidilserina, uma ferramenta utilizada para se detectar a apoptose (VAN ENGELAND, 1998).

4.1. Reguladores do processo apoptótico

A homeostase tecidual é dependente do perfeito balanço entre proliferação e morte celular, que são eventos intimamente acoplados. Alguns reguladores do ciclo celular participam em ambos os processos, morte celular programada e divisão celular. A relação

entre ciclo celular e apoptose é reconhecida pelos genes que codificam as proteínas c-Myc, p53, pRb, Ras, PKA, PKC, Bcl-2, NF- κ B, CDK, ciclinas e CKI. Após estímulo, estas proteínas podem induzir proliferação celular, parada do ciclo ou morte celular. O “background” genético e o microambiente celular são importantes, assim como a extensão de danos ao DNA e o nível de diferentes proteínas (VERMEULEN et al., 2003).

As proteínas da família Bcl-2 apresentam uma importante função anti-apoptótica, que é regulada por multi-sítios de fosforilação envolvendo interações entre várias proteínas da família (HALDAR et al., 1995; YAMAMOTO et al., 1999). Níveis elevados de proteínas dessa família de genes (Bcl-2 e Bcl-x) bloqueiam a apoptose e outras (Bax, Bad e Bak) promovem-na. Essa família está envolvida no balanço entre sinais de morte internos e na superfície celular (VERMEULEN et al., 2003).

A proteína Bcl-2 está localizada na membrana mitocondrial externa e no envelope nuclear. Dentre suas atuações está o bloqueio da liberação de citocromo c pela mitocôndria após estímulo apoptogênico, impedindo, portanto, a ativação de caspases (YAMAMOTO et al., 1999). A proteína Bax pode produzir heterodímeros com a Bcl-2 (Bax/Bcl-2) ou homodímeros (Bax/Bax). Desta forma, Bcl-2 suprime a morte celular quando heterodimerizada com Bax e, por outro lado, o homodímero Bax/Bax promove apoptose. O mecanismo de controle da apoptose pelos genes da família Bcl-2 envolve a formação de poros na membrana mitocondrial, permitindo a interação de várias proteínas envolvidas na regulação da morte celular (GOTTLIEB, 2000; VERMEULEN et al., 2003). Ela também pode bloquear a apoptose causada pelo c-Myc (LUO et al., 1997).

A proteína c-Myc é uma fosfoproteína nuclear que funciona como um fator de transcrição estimulando a progressão do ciclo celular e a apoptose. A expressão de c-Myc é regulada por fosforilação e interação com outras proteínas celulares. É um gene de resposta inicial, ou seja, responde diretamente a sinais mitogênicos estimulando a passagem das células da fase G1 do ciclo celular. Pode exercer seu efeito na progressão do ciclo celular pela transcrição de genes importantes no controle do ciclo celular, tais como ciclinas, quinases e outros fatores de transcrição. Ao mesmo tempo atua como regulador negativo da parada do ciclo celular, suprimindo a transcrição de alguns genes envolvidos. Além do seu papel no ciclo celular, c-Myc também apresenta um papel chave na regulação do processo apoptótico. Trabalhos anteriores mostraram que tanto a superexpressão quanto a diminuição da expressão de c-Myc pode levar a morte celular (THOMPSON, 1998; CONZEN et al., 2000).

Os eventos moleculares envolvidos no processo de apoptose induzida por c-Myc não estão bem compreendidos. Em geral, a indução de apoptose por c-Myc parece ocorrer quando há privação de fatores de sobrevivência celular. c-Myc pode envolver as vias independente ou dependente de p53, transativando o gene promotor da proteína p53 e aumentando sua meia-vida. A indução de apoptose por c-Myc pode também estar relacionada com a liberação de citocromo c envolvendo proteínas Bax (pró-apotóticas) funcionalmente ativas e com a expressão de Fas ligante e de receptor Fas (REYNOLDS et al., 1994).

Um outro importante gene envolvido no processo de morte e proliferação celular é o supressor tumoral p53, que se encontra acumulado no citoplasma durante a fase G1 e migra para o núcleo no início da fase de síntese (fase S). A proteína p53, cujo nome refere-se à massa molecular, é amplamente conhecida como indutora de parada do ciclo celular e de apoptose. Esses processos são regulados por transativação de genes envolvidos em diferentes funções celulares, mas p53 também ativa mecanismos independentes de transcrição gênica (HAUPT et al., 1995; AGARWAL et al., 1998; VERMEULEN et al., 2003).

Normalmente, a proteína p53 é encontrada na célula em níveis basais, sugerindo que seja uma proteína requerida pelas células ocasionalmente em circunstâncias especiais. A indução de aumento nos níveis da proteína p53 em cultura inibe a proliferação celular. Assim, a célula permanece na fase G1 do ciclo celular, o chamado ponto de checagem da integridade do material genético, impedindo sua passagem para a fase S. Células expostas à irradiação e que não codificam a proteína p53 continuam dividindo-se e replicando o DNA sem pausa para o reparo de lesões no DNA (VERMEULEN et al., 2003; HAUPT et al., 2003).

Outra proteína, a retinoblastoma (pRb), inibe a progressão do ciclo celular pela interação com fatores de transcrição tais como E2F. Quando a pRb torna-se fosforilada, o fator E2F é liberado estimulando a proliferação. Além do papel da pRb no ciclo celular, essa proteína também atua na regulação negativa do processo apoptótico. O fator E2F induz a expressão do fator pró-apoptótico Apaf-1 e evidências sugerem um papel na apoptose seguida de dano no DNA (HARBOUR e DEAN, 2000).

Portanto, p53 e pRb/E2F podem estar diretamente ligados a proliferação celular e apoptose. A proteína p53 ativada causa parada do ciclo celular na fase G1. Nestas condições, a proteína Rb não está fosforilada e as células não podem progredir através do ciclo celular. Por outro lado, pRb fosforilada libera o fator E2F, que induz diretamente a transcrição do

gene que codifica a p53. Portanto, a via apoptótica é dependente da conexão entre p53 e o par pRb/E2F (HIEBERT et al., 1995).

4.2. No ovário

Poucos órgãos, ou mesmo nenhum deles, produzem um paradigma para apoptose assim como o ovário. No ovário, o mecanismo subordinado a decisões de vida ou morte envolve um relacionamento entre moléculas pro e anti-apoptóticas. Morfologicamente a apoptose é encontrada em folículos ovarianos durante a vida fetal e adulta. Durante a vida fetal, a apoptose é localizada no oócito, enquanto que na vida adulta, ela é detectada nas células da granulosa de folículos secundários e antrais (HUSSEIN, 2005).

O início do processo de apoptose, na maioria das linhagens de células ovarianas, provavelmente depende de estímulos célula-específico (ausência ou presença de sinais hormonais) que ativam uma cascata intracelular de eventos. Tem sido demonstrado que os efetores nucleares e citoplasmáticos das vias apoptóticas ovarianas vêm de genes reguladores da apoptose não específicos de tecidos reprodutivos, estando presentes na maioria das células dos mamíferos (KORSMEYER, 1995; WYLLIE, 1995; TILLY, 1996).

As dinâmicas ovarianas são orquestradas por mecanismos moleculares. As mais tardias são mediadas por moléculas pro e anti-apoptóticas. Algumas dessas moléculas estão envolvidas no processo de atresia (Bcl-2, TNF e caspases), seleção/perda folicular (BCL-2, Bax, FSH, inibina, Fas ligante, caspases) e luteólise (Fas/Fas ligante, caspase-3 Bax, pro-inibina, BMP ligante, receptores) (HSUEH et al., 1996; HEIKINHEIMO et al., 1997; VAN NASSAUW et al., 1999; HU et al., 2001; FENWICK e HURST, 2002; ERICKSON e SHIMASAKI, 2003).

Bcl-2, Bax e c-Myc são expressas nas células da granulosa tanto de ovários fetais como de adultos, sugerindo seu possível papel na atresia (NANDEKAR e DHARMA, 2001). Bcl-2 é encontrado principalmente em folículos em desenvolvimento, enquanto Bax é vista principalmente em folículos atrésicos (VAN NASSAUW et al., 1999).

A expressão de proteínas Bcl-2 está presente em todos os componentes do ovário fetal humano para impedir a atividade apoptótica extensiva (ABIR et al., 2002). Essa expressão está relacionada aos níveis de gonadotrofinas onde altos níveis desse hormônio aumentam a expressão da Bcl-2 e diminui a expressão de Bax (SUGINO et al., 2000). Em células da granulosa de folículos atrésicos é encontrada expressão da proteína p53, sugerindo que também exista alguma função dessa proteína durante a atresia folicular (KIM et al., 1999).

4.3. Nas células foliculares

A presença de alterações apoptóticas encontradas nos compartimentos foliculares (células da teca - CT e células da granulosa murais - CG) são altamente variáveis, mesmo em folículos morfologicamente semelhantes. A ocorrência de fragmentação apoptótica do DNA em CT e CG murais não está bem correlacionada com a morfologia dos COC ou a morfologia do próprio folículo. Já o aparecimento de fragmentação das CG e das células do *cumulus* está relacionado com a morfologia dos COC (ZEUNER et al., 2003).

PORTER et al. (2001) constataram que a presença da proteína Fas, do sistema Fas-ligante/Fas-receptor, em CG e CT dependia do estágio folicular, demonstrando que elas possuem papel na sinalização para apoptose nos folículos. As CT podem secretar sinais indutores de apoptose sem exteriorizar em sua superfície de membrana moléculas receptoras indutoras de apoptose, evitando assim sua própria apoptose.

Foi demonstrado que em folículos pequenos a relação Bax e Bcl-2 foi similar, já em folículos médios e grandes foi observada maior presença de Bax, sugerindo que folículos menores tendem a ser mais saudáveis que boa parte dos folículos grandes, que podem estar sendo submetidos ao início do processo de degeneração (YANG e RAJAHAMENDRAN, 2000).

4.4. Nas células do cumulus

As células do *cumulus* (CC) possuem um importante papel na maturação e fertilização pela liberação e mediação de sinais para o oócito (TANGHE et al., 2002). Estas células que estão ao redor do oócito, formando o complexo *cumulus* oócito (COC), ajudam no bloqueio da meiose pela formação de inibidores da maturação (CHANNING et al., 1980), promovem uma maturação citoplasmática apropriada, participam na mediação entre o estímulo do LH e o oócito na retomada da meiose (TANGHE et al., 2002; BUCCIONE et al., 1990; MATTIOLI, 1994).

Muitas funções regulatórias das células do cumulus são realizadas pelas junções comunicantes (TANGHE et al., 2002), mas também são parcialmente exercidas pela liberação de substâncias como progesterona (LI et al., 2000), actina (SIDIS et al., 1998), inibina (IZADYAR et al., 1998) e inibidor da maturação oocitária (OMI) (CHANNING et al., 1980). Para manter os fatores parácrinos em ordem ou a sinalização na qual pode

influenciar o desenvolvimento do oócito, parece ser necessário um número suficiente de células do *cumulus* (HASHIMOTO et al., 1998).

Os COC são controlados por vários mecanismos apoptóticos (TILLY, 1996). Atualmente vem sendo estudadas as possibilidades de células apoptóticas do *cumulus* influenciarem na maturação nuclear, citoplasmática e no desenvolvimento durante a pré-implantação do embrião (YANG e RAJAMAHENDRAN, 2000). Foi demonstrado, em fêmeas de camundongo idosas, um aumento apoptótico em oócitos maturados com a presença de células do *cumulus* em relação aos oócitos maturados sem as CC (desnudos), evidenciando a possibilidade de indução de apoptose pelas CC de camundongos (PERES e TILLY, 1997). Em bovinos observou-se a ocorrência de apoptose em CG e CT, em folículos antrais em atresia, no entanto, contrariamente ao encontrado em camundongos, não foi observado apoptose nas CC (YANG e RAJAMAHENDRAN, 2000).

YUAN et al (2005) observaram que, em bovinos, a ocorrência de apoptose nas células do *cumulus* foi proporcional ao seu número e grau de compactação. Porém, neste mesmo estudo, não foi observada apoptose no oócito bovino, demonstrando assim que diferenças na capacidade de desenvolvimento não são causadas pela apoptose no oócito. O grau de apoptose nas CC é refletido pela morfologia do COC e pode ser utilizada como parâmetro para o potencial de desenvolvimento oocitário.

4.5. No oócito

Mesmo com os progressos realizados no intuito de otimizar os sistemas de cultivo para oócitos bovinos *in vitro*, apenas 40% dos oócitos recuperados de ovários de matadouro conseguem se desenvolver até blastocisto (LONERGAN et al., 2003). Isto pode estar ocorrendo devido ao fato de que oócitos de qualidade inferior são predestinados a entrar no processo de apoptose. A ocorrência de apoptose em oócitos de fêmeas de ratos no estágio MII foi observada (TAKASE et al., 1995; FUJINO et al., 1996). Esses achados foram confirmados por PEREZ et al. (1999), que detectaram evidências de apoptose (fragmentação do DNA e atividade de caspases) em oócitos ovulados de fêmeas de ratos.

No ovário, ocorre grande quantidade de apoptose durante a vida fetal e após o nascimento como parte integrante do desenvolvimento ovariano normal. A morte de células ovarianas é um processo essencial para manter a homeostasia da função ovariana. A fragmentação do DNA em oócitos (em particular oócitos em VG e MI) pode ser uma consequência do stress durante a maturação folicular ou estar correlacionada a condições de

hipoxia resultante do comprometimento da microcirculação nesses folículos (VAN BLERKOM, 1996). A apoptose pode então representar um caminho para eliminar oócitos com desordens numerais e estruturais. Porém, a morte celular programada também pode ser uma expressão do stress metabólico causado em condições de cultivo *in vitro*, como demonstrado por WU et al (2000) em oócitos humanos maturados *in vitro*.

O DNA mitocondrial é mais sensível a mutações do que o DNA nuclear. Esta característica da mitocôndria parece ter um papel crucial no controle vida/morte do oócito (PEREZ et al., 2000). Disfunções estruturais, espaciais e genéticas que afetam a capacidade da mitocôndria em produzir ATP pela fosforilação oxidativa, podem afetar a organização normal do fuso e segregação cromossômica, o tempo do ciclo celular e o processo morfodinamico, alterando assim o desenvolvimento embrionário (VAN BLERKOM, 2004). Disfunções mitocondriais podem iniciar ou contribuir para ativação da apoptose.

4.6. Ação do NO na apoptose

Diversos efeitos na citotoxicidade podem ser causados pelo NO, mas seu efeito é mais complexo em relação à apoptose. A morte celular mediada pela apoptose é controlada por sinais celulares específicos. O óxido nítrico pode tanto proteger quanto mediar a célula desse tipo de morte celular, dependendo do tipo da célula, da sua concentração e do tempo de exposição ao NO. A proteção pode ocorrer em diferentes condições. Por exemplo, o NO protege os hepatócitos *in vivo* da apoptose induzida pelo TNF α (BOHLINGER *et al.*, 1995) e também os folículos ovarianos da degeneração causada pela atresia em ratas (CHUN *et al.*, 1995). Por outro lado, o NO participa na apoptose de neurônios corticais (BONFOCO *et al.*, 1995), macrófagos (TERENZI *et al.*, 1995) e células pancreáticas, entre outros (MESSMER *et al.*, 1994). A morte celular mediada pelo NO em macrófagos é inibida por antagonistas dos fatores ativadores das proteínas quinase A e C, sugerindo que a transdução de sinais através destas proteínas está envolvida no mecanismo de ação do NO que leva à apoptose (MESSMER *et al.*, 1995).

A respiração celular não é apenas regulada pelas concentrações de O₂ e ADP, mas também pelos níveis de NO (BOVERIS et al., 1999). Um dos primeiros alvos para a ação citotóxica do NO é a mitocôndria (MONCADA *et al.*, 1991). A inibição da mitocôndria mediada pelo NO parece ter um componente reversível e irreversível. O NO pode interagir diretamente com a citocromo c oxidase para inibir reversivelmente a respiração celular (LISDERO *et al.*, 1996; SHIVA *et al.*, 2001) e esta interação ocorre quando o NO se

encontra em baixas concentrações. Entretanto, como ocorre em condições inflamatórias, o complexo I (NADH-ubiquinona oxidoreductase) e o complexo II (succinato-ubiquinona oxidoreductase) são irreversivelmente inibidos pelo NO (BROWN, 1995).

Quando em baixas concentrações, o NO transmite sinais extracelulares para alvos intracelulares e regula a progressão da meiose. Quando em altas concentrações, o NO pode reagir com o superóxido (O_2^-) e produzir um outro radical ainda mais tóxico, o peroxinitrito ($ONOO^-$) (ESPEY et al., 2000). Elevados níveis de NO podem inibir a glicólise, respiração mitocondrial e replicação do DNA (BRUNE e MOHR, 2001). Esta ação é acentuada pela desaminação da base dos nucleotídeos do NO e do peroxinitrito resultando em fragmentação do DNA. Altas concentrações de NO tem ação pro-apoptótica, aumentando a expressão do supressor tumoral p53 (HAENDELER et al., 1999) e a formação da proteína Bax, assim como causando a liberação do citocromo c e a queda nos níveis de glutathione (BUSTAMANTE et al., 2000) dando início aos caminhos apoptóticos.

Foi demonstrado que um aumento na produção mitocondrial de NO está associado a uma diminuição da respiração mitocondrial, que diminui a GSH mitocondrial e libera o citocromo c durante o processo de apoptose em timócitos, sugerindo que o NO está envolvido no passo inicial da sinalização mitocondrial que leva à apoptose (VALDEZ et al., 2000). Estas reações podem levar a um aumento no número de oócitos danificados. Sendo assim, a ação do NO pode estar envolvida com patologias reprodutivas que elevam sua concentração.

O entendimento do papel dos radicais livres na infertilidade feminina ainda não está completo. Devido ao fato da existência de sistemas oxidativos e anti-oxidativos em vários tecidos reprodutivos femininos, sugere-se que a infertilidade e certas doenças reprodutivas, como a endometriose, podem ser causadas pelo estresse oxidativo (AGARWAL *et al.*, 2003). Folículos pré-ovulatórios contêm muitas fontes de radicais livres, tais como macrófagos, neutrófilos e células da granulosa (OYAWOYE *et al.*, 2003). O fluido folicular contém altas concentrações de antioxidantes, os quais protegem o oócito de danos produzidos pelos radicais livres.

Em uma situação de estresse oxidativo as células apresentam dois mecanismos de defesa importantes: um tampão redutor tiol consistindo de pequenos peptídeos com moléculas sulfidríla redox-ativas: glutathione (GSH) e tioredoxina (TRX), e um sistema enzimático (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX) (YU, 1994; GABBITA et al., 2000; MATÉS, 2000; DAVIS JÚNIOR et al., 2001; CURTIN et al., 2002).

Em condições normais, mais de 95% da GSH nas células está reduzida; portanto o ambiente intracelular é, normalmente, altamente redutor. Investigações sobre o papel da GSH na modulação da sinalização apoptótica sugerem que alterações redox no ambiente intracelular induzido por agentes citotóxicos também são modulados pela geração de EROs e pela extrusão de GSH das células (GHIBELLI et al., 1995). Vários estudos demonstram uma diminuição de GSH intracelular concomitante a um aumento em EROs no processo de morte celular por apoptose (ODA et al., 1999; XU e THORNALLEY, 2001).

É possível que um desequilíbrio no sistema pro-oxidante/antioxidante no fluido folicular possa levar a um desenvolvimento anormal do oócito, assim como danificar seu DNA, citoesqueleto e membrana, prejudicando a fertilidade. O citoesqueleto participa da meiose nos oócitos, e esta etapa é um pré-requisito para que ocorra uma fertilização adequada. Pesquisas devem ser realizadas para se definir os mecanismos que estão envolvidos em doenças do trato reprodutivo feminino, causadas por radicais livres, e também para se criar novas estratégias que poderão conter o estresse oxidativo.

5. Células do *cumulus* - oócito

No folículo antral ovariano o *cumulus oophorus* é um grupo de células da granulosa intimamente associadas (chamadas de células do *cumulus*, CC), que possui um papel crucial durante os processos de maturação e fertilização em oócitos de mamíferos (TANGHE et al., 2002). As CCs exercem uma importante função biológica: antes da ovulação, elas auxiliam na maturação citoplasmática e logo após a ovulação elas participam do controle na interação entre oócito e espermatozóide (TESARIK, 1990). As células do *cumulus* se comunicam umas com as outras e com o oócito via junções comunicantes (GILULA et al., 1978), que permite a transferência de pequenas moléculas como nutrientes e mensageiros entre células somáticas e germinativas (de LOOS et al., 1991).

É bem estabelecido que o oócito precisa das CCs que o rodeia. Os oócitos não metabolizam bem a glucose (LEESE e BARTON, 1984) e são dependentes das CCs para produzir piruvato (LEESE e BARTON, 1985), outros glicolíticos e aminoácidos (COLONNA e MANGIA 1983), que são essências para o crescimento e desenvolvimento. Entretanto, foi demonstrado que o oócito não é simplesmente um recipiente passivo, mas sim um regulador chave do seu próprio desenvolvimento. Os oócitos são capazes de influenciar as CCs ao seu redor e regular seu microambiente através de uma sinalização parácrina,

utilizando fatores secretados pelo oócito (OSFs), como o fator de diferenciação do crescimento 9 (GDF-9) (GILCHRIST et al., 2008)..

Enquanto promove o crescimento, o oócito também previne a morte das CCs. A remoção microcirúrgica dos oócitos do COC gera um aumento na apoptose das CCs, que é revertida pela exposição aos OSFs (HUSSEIN et al., 2005). Os oócitos são capazes de estimular a expressão de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) e suprimir a expressão de proteínas pró-apoptóticas (Bax) nas CCs. Os OSFs também tem ação pró-apoptótica, sendo capazes de conter o efeito de injúrias externas que causariam morte celular (HUSSEIN et al., 2005).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEYDEERA, L.R.; WANG, W-H.; CANTLEY, T.C.; RIEKE, A.; DAY, B.N. (1998) Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after in vitro fertilization: Relevance to intracellular glutathione. *Biol. Reprod.* 58:213-218.
- ABIR, R.; ORVIETO, R.; DICKER, D.; ZUKERMAN, Z.; BARNETT, M.; FISCH, B. (2002) Preliminary studies on apoptosis in human fetal ovaries. *Fertil. Steril.* 78(2):259-64.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. (2005) Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3:28.
- AGARWAL, A.; SALEH, R.A.; BEDAIWY, M.A. (2003) Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* 79:829-843.
- AGARWAL, M. L. AGARWAL, A.; TAYLOR, W. R.; CHERNOVA, O.; SHARMA, Y.; STARK, G. R. (1998) A p53-dependent S-phase checkpoint helps to protect cells from DNA damage in response to starvation for pyrimidine nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:1475-1480.
- AHRINGER, J. (2003) Control of cell polarity and mitotic spindle positioning in animal cells. *Cu.t Opin. in Cell Biol.* 15:73–81.
- AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. (1993) Relationship between iron-catalyse lipid peroxidation potential and human sperm function. *J.Reprod.Fertil.* 98: 257-265.
- ALI, A. A.; BILODEAU, J. F.; SIRARD, M. A. (2003) Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 59:939–49.
- BAGOWSKI, C.P.; MYERS, J.W.; FERRELL, Jr. J.E. (2001) The classical progesterone receptor associates with p42 MAPK and is involved in phosphatidylinositol 3-kinase signaling in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 276:37708–37714.

- BAYAA, M.; BOOTH, R.A.; SHENG, Y.; LIU, X.J. (2000) The classical progesterone receptor mediates *Xenopus* oocyte maturation through a nongenomic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:12607–12612.
- BEKER, A.R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. (2002) Effect of 17beta-estradiol on the in vitro maturation of bovine oocyte. *Theriogenology* 58: 1663-1673.
- BEVERS, M.M. DIELEMAN, S.J.; HURK, R.; VAN DEN. IZADYAR, F. (1997) Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology* 41:13-22.
- BIGGINS, S.; WALCZAK, C. E. (2003) Captivating capture: how microtubules attach to kinetochores. *Cur. Biol.* 13: 449–460.
- BILLIG, H.; TORNELL, J.; CARLSON, B.; HILLENSJO, T.; AHREN, K. (1988) Development and function of the reproductive organs. *Ares-Serono Symposia Italy* pp. 161-170.
- BLASHKIV, V.T.; KORNIICHUK, N.A.; VOZNESENSKAYA, Y.U.T.; PORNICHENKO, G.A. (2001) Role of nitric oxide in ovulation, meiotic maturation of oocytes, and implantation in mice. *Bolletín Exp. Biol. Med.* 132:494-496.
- BOHLINGER, I.; LEIST, M.; BARSIG, J.; UHLIG, S.; TIEGS, G.; WENDEL, A. (1995) Interleukin-1 and nitric oxide protect against tumor necrosis factor alpha-induced liver injury through distinct pathways. *Hepatology* 22:1829-1837.
- BONFOCO, E.; KRAINC, D.; ANKARCRONA, M.; NICOTERA, P.; LIPTON, S.A. (1995) Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with *N*-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:7162-7166
- BOSCO, L.; RUVOLO, G.; MORICI, G.; MANNO, M.; CITTADINI, E.; ROCCHERI, M.C. (2005) Apoptosis in human unfertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 84:1417-23.
- BOVERIS, A. S. L.; ARNAIZ, J.; BUSTAMANTE, S.; ALVAREZ, L.; VALDEZ, A.; BOVERIS D.; NAVARRO A. (2002) Pharmacological regulation of mitochondrial nitric oxide synthase. *Nitr. Ox.* 359, 328-339.
- BOVERIS, A.; COSTA, L.; CADENAS, E.; PODEROSO, J.J. (1999) Regulation of mitochondrial respiration by adenosine diphosphate, oxygen and nitric oxide. *Meth. Enzymol.* 301:188-198.

- BRAD, A.M.; BORMANN, C.L.; SWAIN, J.E.; DURKIN, R.E.; JOHNSON, A.E.; CLIFFORD, A.L. (2003) Glutathione and adenosine triphosphate content of in vivo and in vitro matured porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 64: 492-498.
- BRADEN, A.W.H.; AUSTIN, C.R.; DAVID, H.A. (1954) The reaction of zona pellucida to sperm penetration. *J. Exp. Zool.* 180: 251-266.
- BREVINI, T. A. L.; LONERGAN, P.; CILLO, F.; FRANCISCI, C.; FAVETTA, L. A.; FAIR, T.; GANDOLFI, F. (2002) Evolution of mRNA polyadenylation between oocyte maturation and first embryonic cleavage in cattle and its relation with developmental competence. *Mol. Reprod. Dev.* 63: 510-7.
- BROWN, G.C. (1995) Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 369: 136-139.
- BRUNE, B. (2005) The intimate relation between nitric oxide and superoxide in apoptosis and cell survival. *Antioxid. Redox Signal* 7:497-507.
- BRUNE, B.; MOHR, S. (2001) Protein thiol modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and caspase-3 by nitric oxide. *Curr. Prot. Pept. Sci.* 2:61-72.
- BRUNET, S.; MARO, B. (2005) Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction* 130:801-811
- BRUNET, S.; PAHLAVAN, G.; TAYLOR, S.; MARO, B. (2003) Functionality of the spindle checkpoint during the first meiotic division of mammalian oocytes. *Reproduction* 126: 443-450.
- BRUNET, S.; POLANSKI, Z.; VERLHAC, M.H.; KUBIAK, J.Z.; MARO, B. (1998) Bipolar meiotic spindle formation without chromatin. *Cur. Biol.* 8:1231-1234.
- BRUNET, S.; SANTA MARIA, A.; GUILLAUD, P.; DUJARDIN, D.; KUBIAK, J. Z.; MARO, B. (1999) Kinetochore fibers are not involved in the formation of the first meiotic spindle in mouse oocytes, but control the exit from the first meiotic metaphase. *J. Cell Biol.* 146: 1-12.
- BU, S.; XIA, G.; TAO, Y.; LEI, L.; ZHOU, B. (2003) Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. *Mol. Cell. Endocr.* 207: 21-30.

- BU, S.M.; XIA, G.L.; XIE, H.R.; GUO, Y. (2002). Nitric oxide derived from cumulus cells promotes the meiotic resumption in mouse. *Chin. Sci. Bull.* 47:1730–1733.
- BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.C.; EPPIG, J.J. (1990) Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol. Reprod.* 43:543–547.
- BUSTAMANTE, J.; BERSIER, G.; ROMERO, M.; BADIN, R.A.; BOVERIS, A. (2000) Nitric oxide production and mitochondrial dysfunction during rat thymocyte apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 376:239-247.
- CALARCO, P. G. (2005) The role of microfilaments in early meiotic maturation of mouse oocytes. *Microsc. Microan.* 11: 146–153.
- CALDER, M.D.; CAVENEY, A. N.; SMITH, L.C.; WATSON, A. J. (2003) Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. *Reprod. Biol. Endocr.* 1:1–14.
- CAMPBELL, M. K. (2000) O metabolismo em perspectiva. *In: Bioquímica 3. ed. Porto Alegre: Artmed* p. 652-684.
- CARSOL, M. A.; POULIQUEN, I.; GIAMARCHI, P.; LESGARDS, G.; SERGENT, M.; LUU, R. P. T. (1996) *Analisis*, 24, 195.
- CETICA, P. D.; PINTOS, L. N.; DALVIT, G. C., BECONI, M. T. (2001) Antioxidant enzyme activity and oxidative stress on bovine oocyte in vitro maturation. *Iubmb Life* 51:57–64.
- CHANNING, C.P.; SCHAERF, F.W.; ANDERSON, L.D.; TSAFRIRI, A. (1980) Ovarian follicular and luteal physiology. *Int. Rev. Physiol.* 22:117–201.
- CHERR, G.N.; DUCIBELLA T. (1990) Activation of the mammalian egg: cortical granule distribution, exocytosis, and the block to polyspermy. *In BD Bavister J, Cummins ERS, Roldan: "Fertilization in mammals" Norwell, MA Serono Symposia* pp 309-334.
- CHUN, S. Y.; EISENHAEUER, K.M.; KUBO, M.; HSUEH, A.J. (1995) Inter-leukin-1 beta suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. *Endocrinology* 136:3120-2127.

- CHUN, S.Y.; EISENHA, U.; ER, K.M.; MINAMI, S.; BILLIG, H.; PERLAS, E.; HSUEH, A.J. (1996) Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 137:1447-56.
- COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. (1963) Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry*, 2, 1420.
- COLONNA, R.; MANGIA, F. (1983) Mechanisms of amino acid uptake in cumulus-enclosed mouse oocytes. *Biol. Reprod.* 28: 797-803.
- COMPORTI, M. (1989) Three models of free radical induced cell injury. *Chem. Biol. Inter.* 72: 1-56.
- CONNORS, S. A.; KANATSU-SHINOHARA, M.; SCHULTZ, R. M.; KOPF, G. S. (1998) Involvement of the cytoskeleton in the movement of cortical granules during oocyte maturation, and cortical granule anchoring in mouse eggs. *Dev. Biol.* 200: 103-115.
- CONTI, M.; NEMOZ, G.; SETTE, C.; VIVINI, E. (1995) Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases. *Endocr. Rev.* 16:370-389.
- CONZEN, S.D.; GOTTLOB, K.; KANDEL, E. S.; KHANDURI, P.; WAGNER, A. J.; O'LEARY, M.; HAY, N. (2000) Induction of cell cycle progression and acceleration of apoptosis are two separable functions of c-Myc: transrepression correlates with acceleration of apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 20: 6008-18.
- CRAN, D.G., ESPER, C.R. (1990) Cortical granules and the cortical reaction in mammals. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 42: 177-188.
- CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. (2002) Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol. Methods.* 265: 49-72.
- DAVIS JÚNIOR, W.; RONAI, Z.; TEW, K. D. (2001) Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *Perspect. Pharmacol.* 296: 1-6.
- DE LAMIRANTE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. (1997) Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev. Reprod.* 2: 48-54.
- de LOOS, F.; KASTROP, P.; VAN MAURIK, P.; VAN BENEDEN, T.H.; KRUIP, T.A. (1991) Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Mol. Reprod. Develop.* 28:255-259.

- DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C. (2000) The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: Effect of β – mercaptoethanol, cystein and cystin. *Theriogenology* 53:761-771.
- DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F. (1997) Glutathione synthesis during in vitromaturation of bovine oocytes: Role of cumulus cells. *Biol. Reprod.* 57:1420-1425.
- DEL CORSO, A.; CAPPIELLO, M.; MURA, U. (1994) Thiol-dependent oxidation of enzymes: the last chance against oxidative stress. *Int. J. Biochem.* 26:745–50.
- DENEKE, S.M.; FANBURG, B.L. (1989) Regulation of cellular glutathione. *Am. J. Physiol.* 257:163-173.
- DENG, M.; WILLIAMS, C.J.; SCHULTZ, R.M. (2005) Role of MAP kinase and myosin light chain kinase in chromosome-induced development of mouse egg polarity. *Dev. Biol.* 278: 358–366.
- DIXIT, D. V.; PARVIZI, N. (2001) Nitric oxide and the control of reproduction. *Anim Reprod. Sci.* 65: 1-21.
- DOREE, M.; HUNT, T. (2002) From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J. Cell Sci.* 115:2461–2464.
- DOWNES, S.M., COTTOM, J., HUNZICKER-DUNN, M. (2001) Protein kinase C and meiotic regulation in isolated mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 58:101–115.
- ELFERING, S. L.; SARKELA, T. M.; GIULIVI, C. (2002) Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 277: 38079-38086.
- ELLIS, R.E.; YUAN, J.Y.; HORVITZ, H.R. (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:663-98.
- EPPIG, J.J. (1989) The participation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in the regulation of meiotic maturation of oocyte in the laboratory mouse. *J. Reprod. Fertil.* 38, 3.
- EPPIG, J.J. (1996) Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 8:485-489.
- EPPIG, J.J.; VIVIEROS, M.M.; MARIN-BIVENS, C.; DE LA FUENTE, R. (2004) Regulation of mamalian oocyte maturation. In *The Ovary, Eds Leung, PCK; Adashi, EY. Amsterdam: Elsevier Academic Press* pp 113-129.

- ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. (2003) The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod. Biol. End.* 5:1-9.
- ESPEY, M.G.; MIRANDA, K.M.; FEELISCH, M. (2000) Mechanisms of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress. *Ann. New York Acad. Sci.* 899:209-221.
- FAN, H.Y.; SUN, Q.Y. (2004) Activity of MAPK/p90rsk during fertilization in mice, rats, and pigs. *Mol. Biol.* 253:293-304.
- FENWICK, M.A.; HURST, P.R. (2002) Immunohistochemical localization of active caspase-3 in the mouse ovary: growth and atresia of small follicles. *Reproduction* 124:659–665.
- FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P.A.A.S. (2009) Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 71: 836-48
- FISSORE, R.A.; HE, C.L.; WOUDE, G.F.V. (1996) Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiotic resumption in bovine oocytes. *Biol.Reprod.* 55: 1261-1270.
- FORESTI, R.; CLARK, J.E.; GREEN, C.J.; MOTTERLINI, R. (1997) Thiol compounds interact with nitric oxide in regulating heme oxygenase-1 induction in endothelial cells. Involvement of superoxide and peroxynitrite anions. *J. Biol. Chem.* 272: 18411-18417.
- FOWLER, C.J.; CALLINGHAM, B.A. (1978) Substrate-selective activation of rat liver mitochondrial monoamine oxidase by oxygen. *Bioch. Pharm.* 2: 1995-2000.
- FRANK, S.; ZACHAROWSKI, K.; WRAY, G.M.; THIEMERMANN, C.; PFEILSCHIFTER, J. (1999) Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a novel nitric oxide-regulated gene in rat glomerular mesangial cells and kidneys of endotoxemic rats. *FASEB J.* 13:869-82.
- FUJINO, Y.; OZAKI, K.; YAMAMASU, S.; ITO, F.; MATSUOKA, I.; HAYASHI, E. (1996) DNA fragmentation of oocytes in aged mice. *Hum. Reprod.* 11:1480–3.
- FULKA-JR, J.; FIRST, N. L.; MOOR, R. M. (1998) Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol. Hum. Reprod.*4:41–9.

- FUNAHASHI, H.; CANTLEY, T.C.; STUMPF, T.T.; TERLOUW, S.L.; DAY, B. (1994) Use of low-salt culture medium with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.* 51:633-639.
- FUNAHASHI, H.; KOIKE, T.; SAKAI, R. (2008) Effect of glucose and pyruvate on nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes in a chemically defined medium. *Theriogenology* 70: 1041-1047.
- FURNUS, C.C.; DE MATOS, D.G.; PICCO, S.; PERAL GARCÍA, P.; INDA, A.M.; MATTIOLI, G.; ERRECALDE, A.L. (2008) Metabolic requirements associated with GSH synthesis during *in vitro* maturation of cattle oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 109: 88–99.
- GABBITA, S. P. ROBINSON K.A.; STEWART C.A.; FLOYD R.A.; HENSLEY K. (2000) Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. *Free Rad. Biol. Ag. Prog.* 376: 1-13.
- GARDINER, C.S.; REED, D.J. (1994) Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the pre-implantation mouse embryo. *Biol. Reprod.* 51:1307- 1314.
- GASPARRINI, B.; BOCCIA, L.; MARCHANDISE, J.; DI PALO, R.; GEORGE, F.; DONNAY, I.; ZICARELLI, L. (2006) Enrichment of *in vitro* maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology* 65: 275–287.
- GHAFOURIFAR, P.; RICHTER, C. (1997) Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.* 418: 291-296
- GHIBELLI, L. COPPOLA, S.; ROTILIO, G.; LAFAVIA, E.; MARESCA, V.; CIRIOLO, M. R. (1995) Non-oxidative loss of glutathione in apoptosis via GSH extrusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216: 313-320.
- GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. (2008) Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum. Reprod. Up.* 14: 159–177.
- GILL, A.; JAMNONGJIT, M.; HAUMES, S.R. (2004) Androgens promote maturation and signaling in mouse oocytes independent of transcription: a release of inhibition model for mammalian oocyte meiosis. *Mol. Endocr.* 18: 97-104.

- GILULA, N.B.; EPSTEIN, M.L.; BEERS, W.H. (1978) Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *J. Cell Biol.* 78:58–75.
- GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; BEG, M.A.; KOT, K. (2001) Follicle Selection in Cattle: Relationships among Growth Rate, Diameter Ranking, and Capacity for Dominance. *Biol. Reprod.* 65:345-50.
- GIULIVI, C.; PODEROSO, J. J.; BOVERIS, A. (1998) Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol. Chem.* 273, 11038-11043.
- GLOTZER, M. (2005) The molecular requirements for cytokinesis. *Science* 307: 1735–1739.
- GOTTLIEB, R. A. (2000) Role of mitochondria in apoptosis. *Crit. Rev. Eukaryot Gen Expr.* 10:231-239.
- GOUGE, R. C.; MARSHBURN, P.; GORDON, B. E.; NUNLEY, W.; HUET-HUDSON, Y. M. (1998) Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biol. Reprod.* 58:875-879.
- GRAHAM, A.; HOGG, N.; KALYANARAMAN, B.; O'LEARY, V.; DARLEY-USMAR, V.; MONCADA, S. (1993) Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett* 330: 181-185.
- GRISHAM, M. B.; JOURD'HEUIL, D.; WINK, D. A. (1999) Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am. J. Physiol.* 276: 315–321.
- HAENDELER, J.; ZEIHNER, A.M.; DIMMELER, S. (1999) Nitric oxide and apoptosis. *Vitam. Horm.* 57:49-77.
- HALDAR, S.; JENA, N.; CROW, C. M. (1995) Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:4507-4511.
- HARBOUR, J. W.; DEAN, D. C. (2000) Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat. Cell. Biol.* 2:E65-E67.
- HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; TAKAKURA, R.; YAMADA, M.; IMAI, H.; KASHIMA, N. (2000) Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus oocyte complexes. *Mol. Reprod. Dev.* 57: 353-360.

- HASHIMOTO, S.; SAEKI, K.; NAGAO, Y.; MINAMI, N.; YAMADA, M.; UTSUMI, K. (1998) Effects of cumulus cell density during in vitro maturation of the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 49:1451–63.
- HAUPT, S.; BERGER, M.; GOLDBERG, Z.; HAUPT, Y. (2003) Apoptosis – the p53 network. *J. Cell Sci.* 116:4077-4085.
- HEIKINHEIMO, M.; ERMOLAEVA, M.; BIELINSKA, M.; RAHMAN, N.A.; NARITA, N.; HUHTANIEMI, I.T.; TAPANAINEN, J.S.; WILSON, D.B. (1997) Expression and hormonal regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in the mouse ovary. *Endocrinology* 138:3505–3514.
- HERBERT M, LEVASSEUR M, HOMER H, YALLOP K, MURDOCH A & MCDUGALL A (2003) Homologue disjunction in mouse oocytes requires proteolysis of securin and cyclin B1. *Nat. Cell Biol.* 5: 1023–1025.
- HIEBERT, S. W. PACKHAM, G.; STROM, D. K.; HAFFNER, R.; OREN, M.; ZAMBETTI, G.; CLEVELAND, J. L. (1995) E2F-1: DP-1 induces p53 and overrides survival factors to trigger apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 15:6864-6874.
- HOGG, N.; KALYANARAMAN, B.; JOSEPH, J.; STRUCK, A.; PARTHASARATHY, S. (1993) Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett* 334:170-174.
- HSUEH, A.J.; EISENHAEUER, K.; CHUN, S.Y.; HSU, S.Y.; BILLIG, H. (1996) Gonadal cell apoptosis. *Rec. Prog. Horm. Res.* 433–456.
- HU, C.L.; COWAN, R.G.; HARMAN, R.M.; PORTER, D.A.; QUIRK, S.M. (2001) Apoptosis of bovine granulosa cells after serum withdrawal is mediated by Fas antigen (CD95) and Fas ligand. *Biol. Reprod.* 64:518–526.
- HUMBLOT, P.; HOLM, P.; LONERGAN, P.; WRENZYCKI, C.; LEQUARRE, A.S.; JOLY, C.G.; HERRMANN, D.; LOPES, A.; RIZOS, D.; NIEMANN, H.; CALLESEN, H. (2005) Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 63:1149-66.
- HUSSEIN, M. (2005) Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum. Reprod. Up.* 11:162-178.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. (1997) Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47: 23-32.

- IBÁÑEZ, E.; SANFINS, A.; COMBELLES, C. M. H.; OVERSTROM, E. W.; ALBERTINI, D. F. (2005) Genetic strain variations in the metaphase-II phenotype of mouse oocytes matured in vivo or in vitro. *Reproduction* 130: 845-855.
- IGNARRO, L. J. (1996) Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney Int. Suppl.* 55: 2-5.
- INGRAM, A.J.; JAMES, L.; CAI, L.; THAI, K.; LY, H.; SCHOLEY, J.W. (2000) NO inhibits stretch-induced MAPK activity by cytoskeletal disruption. *J. Biol.Chem.* 51:40301-40306.
- INOUE, M.; NAITO, K.; AOKI, F.; TOYODA, Y.; SATO, E.; (1995) Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote* 3: 265-271.
- INOUE, M.; NAITO, K.; NAKAYAMA, T.; SATO, E.; (1998) Mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle breakdown in porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 58: 130-136.
- JABLONKA-SHARIFF, A.; BASURAY, R.; OLSON, L. M. (1999) Inhibitors of nitric oxide synthase influence oocyte maturation in rats. *J. Soc. Gynecol. Invest.* 6:95-101.
- JABLONKA-SHARIFF, A.; OLSON, L. M. (1998) The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology* 139:2944-2954.
- JAYAWARDANA, B.; SHIMIZU, T.; NISHIMOTO, H.; KANEKO, E.; TETSUKA, M.; MIYAMOTO, A. (2006) Hormonal regulation of expression of growth differentiation factor-9 receptor type I and II genes in the bovine ovarian follicle. *Soc. Reprod. Fertil.* 131:545-553.
- JENUWEIN, T., ALLIS, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science* 293:1074-1080.
- JONES, D. P.; KAGAN, V. E.; AUST, S. D.; REED, D. J.; OMAYE, S. T. (1995) Impact of nutrients on cellular lipid peroxidation and antioxidant defense system. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26: 1-7.
- JONES, K.T. (2004) Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Mol. Hum. Reprod.* 10:1-5.

- JORDÃO-Jr, A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. M.; VANNUCCHI, H. (1998) Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Medicina, Ribeirão Preto*, 31: 434-449.
- KALAB, P.; WEIS, K.; HEALD, R. (2002) Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science* 295: 2452–2456.
- KANATSU-SHINOHARA, M.; SCHULTZ, R.M.; KOPF, G.S. (2000) Acquisition of meiotic competence in mouse oocytes: absolute amounts of p34(cdc2), cyclin B1, cdc25C, and wee1 in meiotically incompetent and competent oocytes. *Biol. Reprod.* 63:1610-6.
- KIM, J. M.; YOON, Y. D.; TSANG, B. K. (1999) Involvement of the Fas/Fas ligand system in p-53 mediated granulosa cell apoptosis during follicular development and atresia. *Endocrinology* 140:2307-2317.
- KIM, N. H.; CHO, S. K.; CHOI, S. H.; KIM, E. Y.; PARK, S. P.; LIM, J. H. (2000) The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during in vitro maturation. *Zygote* 8: 25–32.
- KIM, N. H.; CHUNG, H. M.; CHA, K. Y.; CHUNG, K. S. (1998) Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. *Hum. Reprod.* 13: 2217–2222.
- KIM, N.H.; FUNAHASHI, H.; PRATHER, R.S.; SCHATTEN, G.; DAY, B.N. (1996) Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 43: 248-255.
- KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298:249–258.
- KORSMEYER, S. J. (1995) Regulators of cell death. *Trend. Genet.* 11(3): 101-105.
- KOUSTENI, S.; CHEN, J.R.; BELLIDO, T.; HAN, L.; ALI, A.A.; O'BRIEN, C.A.; PLOTKIN, L.I.; FU, Q.; MANCINO, A.T.; WEN, Y.; VERTINO, A.M.; POWERS, C.C.; STEWART, S.A.; EBERT, R.; PARFITT, A.M.; WEINSTEIN, R.S.; JILKA, R.L.; MANOLAGAS, S.C. (2002) Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids. *Science* 298:843–846.
- KRAGER, K. (2003) Just sit back and relax with sodium nitroprusside. *Depart. free radic. rad. biol.* 77:222.

- KRETZSCHMAR, M. (1996) Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Exp. Toxicol. Pathol.* 48: 439-446.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16: 3–11.
- KRUIP, T.A.M.; CRAN, D.G.; VANBENEDEN, T. (1983) Structural changes in bovine oocytes. *Gamete Res.* 8:29-47.
- KUO, P.C.; ABE, K.Y.; SCHROEDER, R.A. (1996) Interleukin-1-induced nitric oxide production modulates glutathione synthesis in cultured rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 271:851-62.
- KURTZ, A.; GOTZ, K.H.; HAMANN, M.; WAGNER, C. (1998) Stimulation of min secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3. *Proc. Nat. Acad. Sc. USA* 95:4743-4747.
- KUYPERS, F.A.; SCHOTT, M.A.; SCOTT, M.D. (1996) Phospholipid composition and organization in model beta-thalassemic erythrocytes. *Am. J. Hematol.* 51: 45-54.
- LE GUEN, P.; CROZET, N.; HUNEAU, D.; GALL, L. (1989) Distribution and role of microfilaments during early events of sheep fertilization. *Gamete Res.* 22: 411–425.
- LEDAN, E.; POLANSKI, Z.; TERRET, M.E.; MARO, B. (2001) Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. *Dev. Biol.* 232: 400–413.
- LEESE, H.J.; BARTON, A.M (1985) Production of pyruvate by isolated mouse cumulus cells. *J. Exp. Zool.* 234: 231-236.
- LEESE, H.J.; BARTON, A.M. (1984) Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J. Reprod. Fertil.* 72: 9-13.
- LEFEBVRE, C.; TERRET, M. E.; DJIANE, A.; RASSINIER, P.; MARO, B.; VERLHAC, M. H. (2002) Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. *J. Cell Biol.* 157: 603–613.

- LEHMANN, C.; WOLLENBERGER, U.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; SCHELLER, F. W. (1998) Bioelectrocatalysis by a selenoenzyme *J. Electroanal. Chem.*, 455, 259.
- LI, H.; MARSHALL, Z.M.; WHORTON, A.R. (1999) Stimulation of cystine uptake by nitric oxide: regulation of endothelial cell glutathione levels. *Am. J. Physiol.* 276:803-811.
- LI, R.; NORMAN, R.J.; ARMSTRONG, D.T.; GILCHRIST, R.B. (2000) Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biol. Reprod.* 63:839-45.
- LISDERO, C.; RIOBO, N.; SCHOPFER, F.; BOVERIS, A. (1996) Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondrial and submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.* 328: 85-92.
- LIU, Z.; FOOTE, R.H. (1995) Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biol. Reprod.* 53: 786-790.
- LIU, Z.; PATINO, R. (1993) High-affinity binding of progesterone to the plasma membrane of *Xenopus* oocytes: characteristics of binding and hormonal and developmental control. *Biol. Reprod.* 49:980-988.
- LONERGAN, P., RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., FAIR, T., BOLAND, M.P., (2003). Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. Domest. Anim.* 38, 259-267.
- LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PINTADO, B.; FAIR, T.; WARD, F.; FUENTE, J. (2000) Relationship between time of first cleavage and the expression of the IGF-I growth factor, its receptor and two housekeeping genes in bovine two cell embryos and blastocyst produced in vitro. *Mol Reprod Dev* 57:146-52.
- LONGO, F. J. (1987) Actin-plasma membrane associations in mouse eggs and oocytes. *J. Exp. Zoo.* 243: 299-309.
- LONGO, F.J.; CHEN, D.Y. (1985) Development of cortical polarity in mouse eggs: Involvement of the meiotic apparatus. *Dev. Biol.* 107:382-394.
- LOPEZ-FIGUEROA, M.O.; CAAMANO, C.; MORANO, M.I.; RONN, L.C.; AKIL, H.; WATSON, S.J.(2000) Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27:129-133.

- LUBERDA, Z. (2005) The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod. Biol.* 5:5-17.
- LUO, J.; XIAO, J.; TAO, Z.; LI, X. (1997) Detection of c-myc gene expression in nasopharyngeal carcinoma by nonradioactive in situ hybridization and immunohistochemistry. *Chin. Med. J.* 110: 229-232.
- MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E.; TOMANEK, M. (2004) Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology* 61:329-35.
- MANNERVIK, B. (1985) Methods in Enzymology: Glutathione peroxidase. *Academic Press, New York* Vol. 113; p 490.
- MARO, B.; JOHNSON, M.H.; PICKERING, S.J.; FLACH, G. (1984) Changes in actin distribution during fertilization of the mouse egg. *J. Emb. Exper. Morph.* 81:211–237.
- MARO, B.; VERLHAC, M.H. (2002) Polar body formation: new rules for asymmetric divisions. *Nat. Cell Biol.* 4:281–283.
- MASTROIANNI, L.Jr.; JONES, R. (1965) Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. *J. Reprod. Fertil.* 9:99-102.
- MASUI, Y.; MARKERT, C.L. (1971) Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 117:129–146.
- MATÉS, M. (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153: 83-104.
- MATTA, S. G. C.; CALDAS-BUSSIÈRE, M. C.; VIANA, K. S.; FAES, M. R.; PAES DE CARVALHO, C. S.; DIAS, B. L.; QUIRINO, C. R. (2009) Effect of inhibition of synthesis of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide by aminoguanidine on the in vitro maturation of oocyte-cumulus complexes of cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 111: 189-201.
- MATTA, S. G. C.; BUSSIÈRE, M. C. C.; VIANA, K. S.; QUIRINO, C. R. (2002) Efeito de diferentes concentrações do inibidor da síntese de óxido nítrico na maturação nuclear in vitro de oócitos bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 26: 149-151.
- MATTIOLI, M. (1994) Transduction mechanisms for gonadotrophin-induced oocyte maturation in mammals. *Zygote* 2:347–9.

- MEHLMANN, L.M.; JONES, T.L.; JAFFE, L.A. (2002) Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science* 297:1343-5.
- MEHLMANN, L.M.; SAEKI, Y.; TANAKA, S.; BRENNAN, T.J.; EVSIKOV, A.V.; PENDOLA, F.L.; KNOWLES, B.B.; EPPIG, J.J. (2004) The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science* 306:1947-50.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. (1983) Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 711.
- MESSMER, U.K.; ANKARCRONA, M.; NICOTERA, P.; BRUNE, B. (1994) p53 Expression in nitric oxide-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 355:23-26.
- MESSMER, U.K.; LAPETINA, E.G.; BRUNE, B. (1995) Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is antagonized by protein kinase C- and protein kinase A-activating compounds. *Mol. Pharmacol.* 47:757-765.
- MINGOTI, G.Z.; GARCIA, J.M.; ROSA-E-SILVA, A.A. (2002) Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids. *Anim. Reprod. Sci.* 69: 175-186.
- MOELLERING, D.M.C., ANDREW, J., PATEL, R.P., FORMAN, H.J., MULCAHY, R.T., JO, H., DARLEY-USMAR, V.M. (1999) The induction of GSH synthesis by nanomolar concentrations of NO in endothelial cells: a role for gamma-glutamylcysteine synthetase and gamma-glutamyl transpeptidase. *FEBS Lett.* 448:292-6.
- MOHAZZAB-H, K. M.; FAYNGERSH, R. P.; WOLIN, M. S. (1996) Nitric oxide inhibits pulmonary artery catalase and H₂O₂-associated relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 271: 1900-1906.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. (1991) nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.
- MURRAY, A. W.; KIRSCHNER, M. W. (1989) Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 339:275–280.
- NAKAMURA, Y.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N.; TAKAYAMA, H.; KATO, H. (2002) Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biol. Reprod.* 67: 1588-1592.
- NANDEDKAR, T. D.; DHARMA, S. J. (2001) Expression of bcl(xs) and c-myc in atretic follicles of mouse ovary. *Reprod. Biomed. Online.* 3:221-225.

- NATHAN, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6:3051-3064.
- NOHL, H.; GILLE, L.; STANIEK, K. (2005) Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem Pharmacol* 69:719–23.
- NORMAN, J.E.; CAMERON, I.T. (1996) Nitric oxide in the human uterus. *Rev. Reprod.* 1:61-68.
- ODA, T. et al. (1999) Specific efflux of glutathione from the basolateral membrane domain in polarized MDCK cells during ricin-induced apoptosis. *J. Biochem.* 126: 715-721.
- OLIVEIRA, A.T.P.; LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. (2006) Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro with different serum concentrations. *Reprod. Dom. Anim.* 41: 129-136.
- OYAWOYE, O.; ABDEL GADIR, A.; GARNER, A. (2003) Antioxidant and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum. Reprod.* 18:2270-2274.
- PAYNE, D.; KUBES, P. (1993) Nitric oxide donors reduce the rise in reperfusion-induced intestinal mucosal permeability. *Am. J. Physiol.* 265:189-195.
- PEREZ, G.I.; TAO, X.J.; TILLY, J.L. (1999) Fragmentation and death (a.k.a. apoptosis) of ovulated oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* 5: 414-420.
- PEREZ, G.I.; TILLY, J.L.(1997) Cumulus cells are required for the increased apoptotic potential in oocytes of aged mice. *Hum. Reprod.* 12:2781-3.
- PEREZ, G.I.; TRBOVICH, A.M.; GOSDEN, R.G.; TILLY, J.L. (2000). Mitochondria and the death of oocytes. *Nature* 403:500-501.
- PICKERING, S. J.; JOHNSON, M. H.; BRAUDE, P. R.; HOULISTON, E. (1998) Cytoskeletal organization in fresh, aged and spontaneously activated human oocytes. *Hum. Reprod.* 3: 978–989.
- PIGAULT, C.; FOLLENIUS-WUND, A.; SCHMUTZ, M.; FREYSSINET, J. M.; BRISSON, A. (1994) Formation of two-dimensional arrays of annexin V on phosphatidylserine-containing liposomes. *J. Mol. Biol.* 236: 199-208.

- POLANSKI, Z.; LEDAN, E.; BRUNET, S.; LOUVET, S.; KUBIAK, J. Z.; VERLHAC, M. H.; MARO, B. (1998) Cyclin synthesis controls the progression of meiotic maturation in mouse oocytes. *Development* 125: 4989–4997.
- PORTER, D. A. HARMAN, R. M.; COWAN, R. G.; QUIRK, S. M. (2001) Relationship of Fas ligand expression and atresia during bovine follicle development. *Reproduction* 121: 561-566.
- PURCELL, T.L.; GIVEN, R.; CHWALISZ, K.; GARFIELD, R.E. (1999) Nitric oxide synthase distribution during implantation en the mouse. *Mol. Hum. Reprod.* 5:467-475.
- RAZANDI, M.; OH, P.; PEDRAM, A.; SCHNITZER, J.; LEVIN, E.R. (2002) ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol. Endocr.* 16:100–115.
- RETTORI, V.; McCANN, S.M. (1998) Role of nitric oxide and alcohol on gonadotropin release *in vitro* and *in vivo*. *NY Acad. Sci.* 840:185-193.
- REYNOLDS, J. E.; YANG, T.; QIAN, L.; JENKINSON, J. D.; ZHOU, P.; EASTMAN, A.; CRAIG, R. W. (1994) Mcl-1, a member of the Bcl-2 family, delays apoptosis induced by c-Myc overexpression in Chinese hamster ovary cells. *Canc. Res.* 54: 6348-52.
- ROSSELLI, M.; KELLER, P.J.; DUBEY, R.K. (1998) Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum. Reprod.*, 4:3-24.
- ROTH, Z.; HANSEN, P.J. (2005) Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal events in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction* 129: 235-244.
- RUBBO, H.; RADI, R.; TRUJILLO, M.; TELLERI, R.; KALYANARAMAN, B.; BARNES, S.; KIRK, M.; FREEMAN, B. A. (1994) Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J. Biol. Chem.* 269:26066-26075.
- SATO, E.; KOIDE, S.S. (1987) Biochemical transmitters regulating the arrest and resumption of meiosis en oocyte. *Int. Rev. Cytol.* 106:1-33.
- SATTERWHITE, L. L.; LOHKA, M. J.; WILSON, K. L.; SCHERSON, T. Y.; CISEK, L. J.; CORDEN, J. L.; POLLARD, T. D. (1992) Phosphorylation of myosin-II regulatory light chain by cyclin-p34cdc2: a mechanism for the timing of cytokinesis. *J. Cell Biol.* 118 595–605.

- SCHMELL, E.D.; GULYAS, B.J. (1980) Ovoperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs. II. Evidence for the enzyme's role in hardening the zona pellucida. *Gamete Res.* 3: 279-290.
- SCHWARZ, K. R. L.; PIRES, P. R. L.; ADONA, P. R.; CÂMARA DE BEM, T. H.; LEAL, C. L. V. (2008) Influence of nitric oxide during maturation on bovine oocyte meiosis and embryo development *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.* 20: 529–536.
- SENGOKU, K.; TAKUMA, N.; HORIKAWA, M.; TSUCHIYA, K.; KOMORI, H.; SHARIFA, D.; TAMATE, K.; ISHIKAWA, M. (2001) Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 58: 252-258.
- SENTUERKER, S.; KARAHALIL, B.; INAL, M.; YILMAZ, H.; MUESLUEMANOGLU, H.; GEDIKOGLU, G.; DIZDAROGLU, M.; (1997) *FEBS Lett.*, 416, 286.
- SESSA, W.C. (1994) The nitric oxide synthase family of proteins. *J. Vasc.Res.* 31:131-143.
- SHAN, X.; AW, T. Y.; JONES, D. P. (1990) Glutathione dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol. Ther.* 44: 61-71.
- SHAUL, P.W. (2002) Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu. Rev. Physiol.* 64:749–774.
- SHIVA, S.; BROOKES, P.S.; PATEL, R.P.; ANDERSON, P.G.; DARLEY-USMAR, V.M. (2001) Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 7212–7217.
- SIDIS, Y.; FUJIWARA, T.; LEYKIN, L.; ISAACSON, K.; TOTH, T.; SCHNEYER, A.L. (1998) Characterization of inhibin/activin subunit, activin receptor, and follistatin messenger ribonucleic acid in human and mouse oocytes: evidence for activin's paracrine signaling from granulosa cells to oocytes. *Biol. Reprod.* 59: 807–12.
- SIRARD MA. (2001) Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 55:1241-54.
- SIRARD, M.A. (1989) Temporary inhibition of *in vitro* meiotic resumption by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. *Theriogenology* 31: 257.

- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65:126-36
- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES, M. (1998) Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology* 49: 483-497.
- SIROTKIN, A.V. (1992) Involvement of steroid hormones in bovine oocytes matured in vitro. *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* 41: 855-858.
- SMITH, D.M.; TENNEY, D.Y. (1980) Effects of steroids on mouse oocyte maturation in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 60:331–338.
- SMITH, L.D.; ECKER, R.E. (1971) The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Dev Biol.* 25: 232-47.
- STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B. (2001) Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol. Reprod.* 64:904–9.
- STRICKER, S. A. (2006) Structural reorganization of the endoplasmic reticulum during egg maturation and fertilization. *Sem. Cell Dev. Biol.*;17:303–13.
- STRYER, L. (1996) Biossíntese de aminoácidos e do hemo. In: *Bioquímica. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.* p. 679-703.
- SU, Y.G., XIA, G.L., BYSKOV, A.G., FU, G.D., YANG, C.R. (1999) Protein kinase C and intracellular calcium are involved in follicle-stimulating hormone-mediated meiotic resumption of cumulus cell-enclosed porcine oocytes in hypoxantine-supplemented medium. *Mol. Reprod. Dev.* 53:51-58.
- SUGINO, N.; SUZUKI, T.; KASHIDA, S.; KARUBE, A.; TAKIGUCHI, S.; KATO, H. (2000) Expression of Bcl-2 and Bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85(11):4379-86.
- SUN, Q.Y.; RUBINSTEIN, S.; BREITBART, H. (1999) MAP kinase activity is down-regulated by phorbol ester during mouse oocyte maturation and egg fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 52: 1-9.

- SUN, Q.Y.; SCHATTEN, H. (2006) Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction* 131: 193-205.
- SUN, Q.Y.; WU, G.M.; LAI, L.; PARK, K.W.; CABOT, R.; CHEONG, H.T.; DAY, B.N.; PRATHER, R.S.; SCHATTEN, H. (2001) Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction* 122:155-163.
- TAKASE, K.; ISHIKAWA, M.; HOSHIAI, H. (1995) Apoptosis in the degeneration process of unfertilized mouse ova. *Toh. J. Exp. Med.* 175:69–76.
- TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M.; DE KRUIF, A. (2002) Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 61:414–24.
- TAO, Y.; XIA, G.L.; BU, S.M.; ZHOU, B.; ZHANG, M.J.; WANG, F.C. (2004). Nitric oxide exerts different functions on porcine oocytes cultured in different models, which is affected by beta-mercaptoethanol. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.* 17: 317– 24.
- TATOYAN, A.; GIULIVI, C. (1998) Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 273, 11044-11048.
- TAYLOR, S. S.; SCOTT, M. I.; HOLLAND, A. J. (2004) The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation. *Chrom. Res.* 12: 599–616.
- TERADA, Y.; FUKAYA, T.; YAJIMA, A. (1995) Localization of microfilaments during oocyte maturation of golden hamster. *Mol. Reprod. Dev.* 41: 486–492.
- TERENZI, F.; DIAZ-GUERRA, M.J.; CASADO, M.; HORTELANO, S.; LEONI, S.; BOSCA, L. (1995) Bacterial lipopeptides induce nitric oxide synthase and promote apoptosis through nitric oxide-independent path-ways in rat macrophages. *J. Biol. Chem.* 270:6017-6021.
- TERRET, M. E.; LEFEBVRE, C.; DJIANE, A.; RASSINIER, P.; MOREAU, J.; MARO, B.; VERLHAC, M. H. (2003) DOC1R: a MAP kinase substrate that control microtubule organization of metaphase II mouse oocytes. *Development* 130: 5169–5177.
- TESARIK J. (1990). Biology of human fertilization: The general and the special. In: Evers JLH, Heineman MJ, editors. From ovulation to implantation. *Amsterdam: Elsevier.* 263–282.

- TESARIK, J.; MENDOZA, C. (1997) Direct non-genomic effects of follicular steroids on maturing human oocytes: oestrogen versus androgen antagonism. *Hum. Reprod. Up* 3: 95-100.
- THALER, C.D.; EPEL, D. (2003) Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: a little dab'll do ya. *Curr. Pharmac. Des.* 9:399-409.
- THOMAS, D. D.; RIDNOUR, L. A.; ISENBERG, J. S.; FLORES-SANTANA, W.; SWITZER, C. H.; DONZELLI, S.; HUSSAIN, P.; VECOLI, C.; PAOLOCCI, N.; AMBS, S.; COLTON, C. A.; HARRIS, C. C.; ROBERTS, D. D.; WINK, D. A. (2008) The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 1;45: 18-31.
- THOMAS, P.; ZHU, Y.; PACE, M. (2002) Progesterin membrane receptors involved in the meiotic maturation of teleost oocytes: a review with some new findings. *Steroids* 67: 511–517.
- THOMPSON, E. B. (1998) The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annu. Rev. Physiol* 60:575-600.
- TIAN, J.; KIM, S.; HEILIG, E.; RUDERMAN, J.V. (2000) Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for *Xenopus* oocyte activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 14358–14363.
- TILLY, J. L. (1996) Apoptosis and ovarian function. *Rev. Reprod.* 1:162-72.
- TOMEK, W.; TORNER, H.; KANITZ, W. (2002) Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. *Reprod. Dom. Anim.*37:86–91.
- TORNELL, J.; BILLIG, H.; HILLENSJO, T. (1991) Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides. *Hum. Reprod.* 6:411-422.
- UHLENBROCK, K., GASSENHUBER, H.; KOSTENIS, E. (2002) Sphingosine 1-phosphate is a ligand of the human gpr3, gpr6 and gpr12 family of constitutively active G protein-coupled receptors. *Cell. Sign.* 14:941–953.
- UHLIG, S.; WENDEL, A. (1992) The physiological consequences of glutathione variations. *Life Sci.* 51: 1083-1094.

- VALDEZ, L.B.; LORES ARNAIZ, S.; BUSTAMANTE, J.; ALVAREZ, S.; COSTA, L.E.; BOVERIS, A. (2000) Free radical chemistry in biological systems. *Biol. Res.* 33:65-70.
- VAN BLERKOM, J. (1996) The influence of intrinsic and extrinsic factors on the developmental potential and chromosomal normality of the human oocyte. *J. Soc. Gynecol. Invest.* 3:3-10.
- VAN BLERKOM, J. (2004) Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction* 128:269-80.
- VAN BLERKOM, J. (2008) Mitochondria as regulatory forces in oocytes, preimplantation embryos and stem cells. *Reprod. Biomed Online* 16:553-69.
- VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P.; ALEXANDER, S. (2000) Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Hum Reprod* 15:2621-33.
- VAN ENGELAND, M.; NIELAND, L. J.; RAMAEKERS, F. C.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C. P. (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31:1-9.
- VAN NASSAUW, L.; TAO, L.; HARRISSON, F. (1999) Distribution of apoptosis-related proteins in the quail ovary during folliculogenesis: BCL-2, BAX and CPP32. *Acta. Histochem.* 101:103-112.
- VELILLA, E.; IZQUIERDO, D.; RODRIGUEZ-GONZALEZ, E.; LOPEZ-BEJAR, M. VIDAL, F.; PARAMIO, M.T. (2004) Distribution of prepubertal and adult goat oocyte cortical granules during meiotic maturation and fertilization: ultrastructural and cytochemical study. *Mol. Reprod. Dev.* 68: 507-514.
- VERLHAC, M.H.; KUBIAK, J.Z.; CLARKE, H.J.; MARO, B. (1994) Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development* 120: 1017-1025.
- VERLHAC, M.H.; KUBIAK, J.Z.; WEBER, M.; GE'RAUD, G.; COLLEDGE, W.H.; EVANS, M.J.; MARO, B. (1996) Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organisation during mouse meiosis. *Development* 122:815-822.

- VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z. N.; VAN BOCKSTAELE, D. R. (2003) Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif.* 36:165-175.
- VIANA, K. S.; CALDAS-BUSSIÈRE, M. C.; MATTA, S.G.C.; FAES, M.R.; PAES DE CARVALHO, C.S.; QUIRINO, C.R. (2007) Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 102: 217-227
- VIGNOLA, A.G.H. (1995) Regulação da maturação nuclear e expansão das células do cumulus pelas proteínas quinase A e C em oócitos bovinos. 84f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Universidade Federal Santa Maria, Santa Maria, R.S.
- VINOT, S.; LE, T.; MARO, B.; LOUVET-VALLE'E, S. (2004) Two PAR6 proteins become asymmetrically localized during establishment of polarity in mouse oocytes. *Curr. Biol.* 14: 520–525.
- WANG, H.F.; ISOBE, N.; KUMAMOTO, K.; YAMASHIRO, H.; YAMASHITA, Y.; TERADA, T. (2006) Studies on the role of steroid hormone in regulation of oocyte maturation in cattle. *Reprod. Biol. Endocr.* 4:4.
- WANG, W. H.; ABEYDEERA, L. R.; PRATHER, R. S.; DAY, B. N. (2000) Polymerization of nonfilamentous actin into microfilaments is an important process for porcine oocyte maturation and early embryo development. *Biol. Reprod.* 62: 1177–1183.
- WELLS, P. G.; KIM, P. M.; LAPOSA, R. R.; NICOL, C. J.; PARMANA, T.; WINN, L. M. (1997) Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutat. Res.* 396, 65.
- WESSEL, G. M.; CONNER, S. D.; BERG, L. (2002) Cortical granule translocation is microfilament mediated and linked to meiotic maturation in the sea urchin oocyte. *Development* 129, 4315-4325.
- WESSEL, G.M.; BROOKS, J.M.; GREEN, E.; HALEY, S.; VORONINA, E.; WONG, J.; JAYDFUDIM, V.; CONNER, S. (2001) The biology of cortical granules. Department of Molecular Biology. *Cell Biol. Bioch.* Brown University. Providence, Rhode Island, 02912. 90.
- WHITAKER, B. D.; KNIGHT, J. W. (2004) Exogenous gamma-glutamyl cycle compounds supplemented to *in vitro* maturation medium influence *in vitro* fertilization, culture, and viability parameters of porcine oocytes and embryos. *Theriogenology* 62: 311-22.

- WINK, D. A.; HANBAUER, I.; GRISHAM, M. B.; LAVAL, F.; NIMS, R.W.; LAVAL, J.; COOK, J. C.; PACELLI, R.; LIEBMANN, J.; KRISHNA, M. C.; FORD, M. C.; JB, M. (1996) The chemical biology of NO: insights into regulation, protective and toxic mechanisms of nitric oxide. *Curr. Top. Cell. Regul* 34:159–187.
- WINK, D. A.; HANBAUER, I.; KRISHNA, M. C.; DEGRAFF, W.; GAMSON, J.; MITCHELL, J. B. (1993) Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:9813-9817.
- WINK, D. A.; MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; PLUTA, R. M.; HEWETT, S. J.; COLTON, C.; VITEK, M.; FEELISCH, M.; GRISHAM, M. B. (2001) Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. *Antioxid. Redox Signal.* 3:203–213.
- WINK, D. A.; MITCHELL, J. B. (1998) The chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 25:434–456.
- WU, J.; ZHANG, L.; WANG, X. (2000) Maturation and apoptosis of human oocytes in vitro are age-related. *Fertil. Steril.* 74:1137– 41.
- WYLLIE, A. H. (1995) The genetic regulation of apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5(1): 97-104.
- WYLLIE, A.H. (1993) Apoptosis (the 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br. J. Cancer.* 67:205-8.
- XU, K.; THORNALLEY, P. J. (2001) Involvement of glutathione metabolism in the cytotoxicity of the phenethyl isothiocyanate and its cysteine conjugate to human leukaemia cells in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 61: 165-177.
- YAMAMOTO, K.; ICHIJO, H.; KORSMEYER, S. J. (1999) Bcl-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol. Cell. Biol.* 19:8469-8478.
- YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. (2000) Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effects of follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in culture bovine granulosa cells. *Biol. Reprod.* 62: 1209-1217.
- YOUNIS, A.L.; BRACKETT, B.G.; FAYER-HOSKEN, R.A. (1989) Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gam. Res.* 23: 189-201.

- YU, B. P. (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74: 139-162.
- YUAN, Y.Q.; VAN SOOMA, A.J.L.; LEROYA, M.R.; DEWULFA, J.; VAN ZEVERENB, A.; DE KRUIFA, A.; PEELMANB, L.J. (2005) Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence *Theriogenology* 63 2147–2163
- ZACHARIAE, W.; NASMYTH, K. (1999) Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Gen. Dev.* 13:2039-58.
- ZEUNER, A.; MÜLLER, K.; REGUSZYNSKI, K.; JEWGENOW, K. (2003) Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during in vitro maturation. *Theriogenology* 59: 1421-1433.
- ZHENG, Y. (2004) G protein control of microtubule assembly. *An. Rev. Cell Dev. Biol.* 20 867–894.
- ZUELKE, K.A.; JEFFAY, S.C.; ZUCKER, R.M.; PERREAULT, S.D. (2003) Glutathione (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 64:106-112.
- ZUELKE, K.A.; JONES, D.P.; PERREAULT, S.D. (1997) Glutathione oxidation is associates with altered microtubule function and disrupted fertilization in mature hamster oocytes. *Biol. Reprod.* 57: 1413-1420.

TRABALHOS

Os dois trabalhos a seguir foram elaborados para futuras publicações, segundo as normas das revistas: *Ciência Rural* e *Animal Reproduction Science*, respectivamente.

- 1) Efeito da adição de óxido nítrico na integridade de membrana e expansão de complexos *cumulus*-oócito de bovinos em diferentes formas de cultivo
- 2) Efeito do óxido nítrico na integridade celular, organização do citoesqueleto, maturação nuclear e citoplasmática do complexo *cumulus*-oócito bovino cultivado *in vitro*

Efeito de diferentes formas de cultivo na ação do óxido nítrico na maturação e integridade de membrana plasmática de complexos *cumulus*-oócito de bovinos

Influence of nitric oxide during cumulus expansion and membrane integrity on cumulus-oocyte complex cultured in different systems

Kelen Salaroli Viana¹ Maria Clara Caldas-Bussiere¹ Carla Sobrinho Paes de Carvalho¹ Bruna Lomba Dias¹ Verônica R Lanes² Celia Raquel Quirino¹

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar se as diferentes formas de cultivo (gota de 150µL de meio coberta com óleo x placa de quatro poços com 500µL de meio) interferem no efeito do óxido nítrico (NO) sobre a maturação e a integridade da membrana plasmática do complexo *cumulus*-oócito de bovinos pela adição de diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (SNP, doador de óxido nítrico). Não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre as formas de cultivo quando se avaliou a integridade de membrana plasmática e expansão das células do *cumulus* (CC). Contudo, foi observado que oócitos dos grupos controle e 10^{-3} M de SNP cultivados em placa apresentaram maior porcentagem de membrana íntegra do que os mesmos grupos cultivados em gota ($P < 0,05$). Quando se avaliou o tipo de tratamento, observou-se que a adição de 10^{-3} M de SNP causou um efeito inibitório na expansão e diminuiu a integridade da membrana das CC e oócito, tanto no cultivo em gota sob óleo quanto em placa, diferindo do grupo controle e do 10^{-5} M de SNP ($P < 0,05$). Semelhante à expansão, a forma de cultivo não interferiu na extrusão do primeiro corpúsculo

¹Setor de Biotecnologias de Embriões, LRMGA/CCTA;

²Laboratório de Biologia do Reconhecer, LBR/CBB; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. E-mail: kelenstv@uenf.br. Autor para correspondência

polar ($P>0,05$), porém, a adição de 10^{-3} M de SNP inibiu esta tanto no cultivo em gota quanto em placa ($P<0,05$). Houve um efeito dose-resposta na concentração de NO no meio de maturação em ambos os tipos de cultivo ($P<0,05$), sendo que esta foi maior no meio de cultivo em gota, exceto quando se adicionou 10^{-3} M de SNP, onde não houve diferença nas diferentes formas de cultivo. Esses dados mostram que o sistema de cultivo não interferiu na ação do NO na maturação *in vitro* de COC bovinos, mas interferiu na integridade da membrana plasmática do oócito.

Palavras-chave: óxido nítrico, integridade de membrana plasmática, maturação do complexo *cumulus*-oócito, diferentes formas de cultivo, bovino.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effect of NO on the cumulus expansion and membrane integrity by the addition of nitroprussiate of sodium (SNP) in the medium of maturation of complex cumulus-oocytes (COC) bovine and if the different forms of culture (drop of 150 μ L of way covered with oil x plate of four wells with 500 μ L of way) intervenes with this effect.. No significant effect was observed between different forms of culture (drop/plate) ($P>$; 0,05), as much for membrane integrity as for expansion of the CC. However, difference between the treatments was observed, since the addition of SNP 10^{-3} M showed an inhibitory effect on the membrane integrity and expansion, in both culture in drops under oil and plate, differing from control and of the 10^{-5} M of SNP, respectively. The concentration of NO on the maturation medium was different between the treatments and types of culture ($P<0.05$). These data demonstrate that the addition of high concentration of

NO to the maturation medium was harmful to the CC in different systems and it leads to death of cumulus cells.

Key-words: nitric oxide, membrane integrity, cumulus expansion, bovine.

INTRODUÇÃO

O óxido nítrico (NO) é um gás altamente reativo com uma meia-vida curta. Ele é rapidamente oxidado para nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-), dois produtos estáveis do metabolismo do NO. Por ser um gás difusível e lipolítico, o NO é um importante mensageiro inter e intracelular que está envolvido em várias etapas da reprodução como esteroidogênese (FAES et al., 2009), integridade da membrana plasmática de células do *cumulus* (MATTA et al., 2009), células da granulosa antrais (FAES et al, 2009) e de espermatozóides (LEAL et al. 2009), além da sobrevivência folicular, ovulação, fertilização e implantação embrionária (THALER & EPEL, 2003).

No folículo ovariano antral, o *cumulus oophorus* é um grupo de células da granulosa (chamadas células do *cumulus* - CC), o qual possui papel crucial durante o crescimento e desenvolvimento oocitário, e nos processos de maturação e fertilização em mamíferos (TANGHE et al., 2002). Foi demonstrado que a adição de 10^{-5} M de nitroprussiato de sódio (SNP, doador de NO) aumentou a taxa de produção de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* (VIANA et al., 2007), enquanto alta concentração de NO (10^{-3} M de SNP) diminui a taxa de COC que apresentaram expansão das células do *cumulus* e que alcançaram a metáfase II (TAO et al., 2005; VIANA et al., 2007). VIANA et al. (2007) sugeriram que este efeito deletério possa ter sido mediado pela ação na integridade da membrana plasmática, visto que a retirada das CC foi realizada com muita facilidade, além do fato de que durante a manipulação do oócito para retirada da zona pelúcida, a membrana plasmática de todos os oócitos tratados com 10^{-3} M de SNP se rompia.

A maturação *in vitro* (MIV) de oócitos é comumente realizada usando gotas de meio de cultivo cobertas com óleo mineral (KA et al., 1997; SHIMADA et al., 2001). Estudos recentes têm utilizado cultivo com placa de quatro poços, utilizando um maior volume de meio de maturação. Esse tipo de sistema de cultivo dispensa a utilização do óleo mineral para evitar a evaporação do meio e alteração da osmolaridade, além de aumentar a disponibilidade de nutrientes e diminuir o estresse causado pela liberação de toxinas produzidas pelo COC durante a maturação (KORHONEN et al., 2008; OKAWARA et al., 2009). Devido à alta capacidade do óleo em absorver substâncias lipossolúveis, envolvidas tanto na MIV como na integridade da membrana plasmática, a concentração dessas pode ser alterada no meio de cultivo durante a maturação do COC (FUNAHASHI et al., 1994). Assim, no tradicional sistema de MIV, o cultivo de COC em meio coberto com óleo mineral pode estar limitando a capacidade de desenvolvimento dos oócitos maturados *in vitro*. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar se as diferentes formas de cultivo (gota de 150µL de meio coberta com óleo x placa de quatro poços com 500µL de meio) interferem no efeito do NO sobre a maturação e a integridade da membrana plasmática do complexo *cumulus*-oócito de bovinos pela adição de diferentes concentrações de SNP.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados foram da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), exceto os mencionados no texto. Ovários de vacas mestiças cíclicas foram obtidos semanalmente em abatedouros. Após a coleta, os ovários foram imediatamente colocados em frascos contendo solução salina e antibiótico em temperatura ambiente. Os folículos foram aspirados usando seringa de 10 mL e os complexos *cumulus*-oócito (COC) foram imediatamente colocados em meio de lavagem [TCM 199-HEPES acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos - 100 UI/mL de penicilina e 100 UI/mL de estreptomicina].

A esse meio foi adicionado 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX, 0,5 mM) para manter o bloqueio da meiose durante o período de manipulação dos mesmos. Após a seleção, os COC foram lavados 4 vezes em gotas de 1000 µL em meio de lavagem sem IBMX antes de serem colocados no meio de maturação. Somente os COC que apresentavam mais de três camadas de CC e ooplasma homogêneo foram selecionados.

Foram utilizados 30 COC para cada tratamento e cada experimento foi repetido 4 vezes. Oócitos selecionados foram distribuídos aleatoriamente em gotas de 150 µL cobertas com óleo mineral ou em placas de quatro poços com 500 µl de meio de maturação [TCM 199 suplementado com 10% de SFB, 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin-V, Bioniche, Beleville, Canadá), 5 µg/mL de LH (Lutropin-V, Bioniche, Beleville, Canadá), e antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 UI/mL de estreptomicina – Merck, Darmstadt, Germany)] e mantidos por 24 h em estufa a 38,5° C, em atmosfera de 5% de CO₂. Os tratamentos consistiram da adição de 0 (controle), 10⁻⁵ e 10⁻³ M de SNP.

O grau de expansão do *cumulus* foi avaliado 24 h após o início da maturação *in vitro*, utilizando um método de classificação subjetiva proposto por TAO et al. (2004) onde: Grau 1 (G 1) - reposta mínima; Grau 2 (G 2) - expansão das camadas externas; Grau 3 (G 3)- expansão de todas as camadas, exceto da corona radiata e Grau 4 (G 4) - expansão de todas as camadas.

Foi utilizado método de coloração dupla para avaliar a integridade da membrana plasmática das CC. Dois corantes fluorescentes foram utilizados: brometo de etídio, o qual marca apenas o núcleo de células que apresentam membrana alterada (cor vermelha), caracterizando então morte celular; e laranja de acridina, o qual marca o DNA de células vivas (cor verde). Ambos corantes foram diluídos na concentração de 100 µg/mL. Para cada 90µL de PBS suplementado com 5% de SFB, 10µL da solução contendo os dois corantes (1:1) diluído em PBS foi adicionado. Após o período de maturação, os COC foram desnudos

mecanicamente por pipetagem em PBS com 5% de SFB. Os oócitos foram retirados do meio e as CC centrifugadas (700 x g) por 10 min e resuspensas em PBS com 5% de SFB contendo os corantes. As células foram colocadas entre lâmina e lamínula, levadas ao microscópio de epifluorescência (400x) (NIKON - Eclipse TE300/TE200, Melville, N.Y., USA) para contagem (200-250 células de cada tratamento). O meio de maturação foi coletado e estocado a -20°C para futura dosagem de NO.

Para observação da integridade da membrana plasmática dos oócitos foi utilizada marcação dupla com Hoescht, o qual marca o DNA de células vivas (cor azul) e Iodeto de propídeo (IP - o qual marca apenas o núcleo de células que apresentam membrana alterada (cor vermelha). Após o período de maturação, os oócitos foram desnudos e expostos ao Hoescht 33258 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 5 min e após este período, ao IP (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 5 min. Os oócitos foram colocados entre lâmina e lamínula com glicerol e observados individualmente com auxílio do microscópio (NIKON - Eclipse TE300/TE200, Melville, N.Y., USA)(400x). Os oócitos foram divididos em dois grupos: 1) com membrana plasmática íntegra, apresentando núcleo corado em azul (marcado com Hoescht) e 2) com perda da integridade da membrana plasmática, apresentando núcleo corado em vermelho (marcado com IP)

A extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP) foi avaliada pela coloração com Hoescht 33258 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 5 min. Os oócitos foram classificados como com CP (quando se observou presença de CP) e sem CP (quando não se observou presença de CP).

A concentração de nitrato/nitrito ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$), metabólitos estáveis do NO, foi determinada pelo método baseado na reação colorimétrica de Griess (RICART-JANE et al., 2002). Todas as soluções foram protegidas da luz desde a preparação até o ensaio. A curva padrão de nitrito de sódio foi diluída em meio de maturação contendo valores de 0,5 a 100 μM . As análises foram realizadas em espectrofotômetro (Multiskan EX Primary EIA V

2.1-0). Com os valores da absorbância foi montado um gráfico de dispersão. A relação entre a absorbância e concentração de nitrato/nitrito foi linear ($R^2=0,98$; $P<0,05$).

Os dados foram avaliados usando o SAS (Statistical Analysis System, Cary, NC, USA) pela análise de variância (ANOVA) para verificar se o sistema de cultivo (gotas cobertas com óleo e placa de quatro poços) interfere no efeito do NO (10^{-5} e 10^{-3} M de SNP) na maturação e na integridade da membrana plasmática dos COC. As médias foram comparadas pelo teste *t* a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

O grau de expansão dos COC do grupo controle e do grupo tratado com 10^{-5} M de SNP foi semelhante nos dois tipos de cultivo (tabela 01; figura 1, A e B), contudo, a expansão foi inibida ($P<0,05$; Figura 1, de A a C) quando se adicionou 10^{-3} M de SNP no meio de cultivo tanto em gota coberta com óleo ($69\pm 10,4\%$ em G1) como em placa de quatro poços ($61,2\pm 7,2\%$ em G1).

Não houve diferença na integridade de membrana das células do *cumulus* quando os diferentes tipos de cultivo foram comparados ($P>0,05$). Porém, ocorreu diferença na integridade de membrana entre os oócitos dos grupos controle e 10^{-3} M de SNP. O cultivo em placa apresentou uma maior porcentagem de oócitos com membrana íntegra (oócitos IP(-)): controle: $91,8\pm 3,1\%$ -óleo e $100\pm 0,0\%$ -placa; 10^{-3} M: $6,7\pm 2,8\%$ -óleo e $19,3\pm 8,1\%$ -placa; $P<0,05$; tabela 2). Quando se avaliou o efeito do tratamento, a adição de 10^{-3} M de SNP promoveu uma diminuição no número de células com membrana íntegra em ambos os tipos de cultivo ($0,75\pm 0,5\%$ das CC e $6,7\pm 2,8\%$ dos oócitos IP(-) na gota e $0,5\pm 0,5\%$ das CC e $19,3\pm 8,2\%$ dos oócitos IP(-) na placa; $P<0,05$; Figura 1, de D a F; tabela 2).

A forma de cultivo não interferiu na porcentagem de oócitos que apresentaram extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP) ($P>0,05$), porém quando se avaliou o tipo de

tratamento, foi observada uma inibição da extrusão do CP quando se adicionou 10^{-3} M de SNP ($P < 0,05$) em ambas as formas de cultivo.

Houve um efeito dose-resposta na concentração de NO no meio de maturação após 24 h em ambas as formas de cultivo ($P < 0,05$), sendo que esta foi maior no meio de cultivo em gota, exceto quando se adicionou 10^{-3} M de SNP, onde não houve diferença nas diferentes formas de cultivo ($P > 0,05$; figura 2).

DISCUSSÃO

No presente estudo, observaram que os COC do grupo controle e 10^{-5} M de SNP apresentaram expansão semelhante nos dois tipos de cultivo, gota coberta com óleo e placa. Porém, essa expansão foi inibida quando se adicionou 10^{-3} M de SNP no meio de cultivo tanto em gota como na placa, corroborando com os resultados observados por VIANA et al. (2007), onde foi observada uma inibição da expansão das células do *cumulus* de COC cultivados em gota utilizando-se a mesma concentração desse doador de NO. Esses dados mostram que o efeito na expansão das CC pela adição de 10^{-3} M de SNP no meio se manteve, mesmo sendo utilizada uma proporção maior oócito/meio (1 oócito/16,7 μ L de meio) em relação à observada na gota (1 oócito/ 5 μ L de meio), sendo também independente da presença de óleo no meio de cultivo.

Além disso, foi observado que após o período de maturação, o meio de cultivo dos COC na gota com óleo dos grupos controle e 10^{-5} M de SNP apresentou alteração da sua coloração, perdendo sua aparência rósea e se tornando amarelado (dados não mostrados), levando a sugerir que houve uma alteração no pH do meio. Essa alteração não foi observada no tratamento com 10^{-3} M de SNP, provavelmente devido ao fato de que como houve inibição da expansão das células do *cumulus*, houve inibição da produção de ácido hialurônico (AH) que como em suínos (YOKOO et al. 2008), apresenta relação direta com a expansão das CC.

No cultivo em placa não foi observado alteração na coloração do meio, demonstrando que uma maior proporção oócito/volume de meio de cultivo presente na placa (1 oócito/16.7 μ l de meio) versus a observada na gota (1 oócito/5 μ l de meio) previne a alteração do pH causada pela produção do ácido hialurônico, deixando o meio mais estável, além da presença de uma maior quantidade de substâncias antioxidantes disponíveis ao oócito e uma menor percentagem de substâncias oxidantes oriundas do metabolismo dos COC.

No presente experimento foi demonstrado que não houve diferença na integridade da membrana das células do *cumulus* oriundas de COC cultivados em gotas ou placa quando estas foram avaliadas pela coloração com LA/BE. Apesar desse resultado, os COC cultivados na placa se apresentaram mais homogêneos e mais claros quando comparados aos cultivados em gotas (dados não mostrados). Ao se avaliar a integridade de membrana dos oócitos, foi observada diferença entre o sistema de cultivo nos grupos controle e 10^{-3} M de SNP, onde o cultivo em placa apresentou um melhor resultado. Porém, essa diferença não foi observada no grupo 10^{-5} M de SNP. Este resultado foi obtido porque o controle em placa apresentou 100% de integridade em relação ao resultado observado em gota ($91,3 \pm 3,1$ %). Assim, a adição de 10^{-5} M de SNP na placa não tinha como aumentar a integridade da membrana plasmática do oócito, como ocorreu na gota. Contudo, os COC cultivados em placa tratados com 10^{-3} M de SNP apresentaram uma integridade de membrana maior do que os cultivados em gota, provavelmente pela maior relação entre oócito/meio. Esses dados sugerem que o cultivo em placa proporciona um ambiente mais favorável para o cultivo de COC bovino do que em gota.

A adição de 10^{-3} M de SNP no meio de maturação inibiu a extrusão do primeiro corpúsculo polar, corroborando com os resultados obtidos por VIANA et al. (2007), que demonstraram que a adição da mesma concentração de SNP no meio de maturação em gota inibiu a progressão da meiose de oócitos bovinos. Juntos, esses dados levam a sugerir que a

adição de alta concentração de NO no meio de maturação induz à morte celular e conseqüente ausência da expansão das células do *cumulus*, ocorrendo assim alteração na maturação de oócitos bovinos.

A concentração de NO no meio de maturação do grupo controle e 10^{-5} M de SNP na gota foi maior do que na placa devido ao fato de que na placa existe uma maior proporção de oócito/meio (1/16,7), fazendo com que o NO produzido pelo COC seja mais diluído no meio. Porém, isto não foi observado quando se adicionou 10^{-3} M de SNP, onde não foi observada diferença entre os tipos de cultivo, sugerindo que este NO possa ter migrado para o óleo após alcançar um certo grau de saturação no meio de maturação.

A presença de morte celular nas CC cultivadas em placa ou em gota e a constatação de que a adição da concentração de NO deletéria no meio de maturação não foi diferente entre os diferentes tipos de cultivo demonstram que a ação do NO ao induzir a morte celular é independente do tipo de sistema de cultivo, levando a sugerir que tais parâmetros envolvem mecanismos independentes de substâncias lipossolúveis.

CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostraram que: 1) o tipo de cultivo não interferiu na resposta das CC a diferentes concentrações de NO; 2) o sistema de cultivo não interferiu na ação do NO na maturação *in vitro* de complexos *cumulus*-oócito bovinos, contudo interferiu na integridade da membrana plasmática do oócito de COC tratados com alta concentração de NO e 3) o sistema de cultivo em placa utilizado durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos aumenta a integridade da membrana plasmática do oócito. Mais estudos devem ser realizados para avaliar se a presença do óleo pode estar levando a alguma alteração na maturação oocitária que pode ter conseqüências durante o desenvolvimento embrionário ou mesmo fetal, diminuindo o número de bezerros nascidos oriundos da FIV.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi financiado pela FAPERJ (E-26/171.059/2005). K.S. Viana recebeu bolsa de doutorado da CAPES.

REFERÊNCIAS

FAES, M. R. et al. Nitric oxide regulates steroid synthesis by bovine antral granulosa cells in a chemically defined medium. **Anim. Reprod. Sci.** v. 110, p. 222-236, 2009.

FUNAHASHI, H. et al. Use of low-salt culture medium with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after in vitro fertilization. **Biol. Reprod.** v. 51, p. 633-639, 1994.

KA, H. H. et al. Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated in vitro. **Biol. Reprod.** 57: 478-483, 1997.

KORHONEN, K. et al. Effects of Serum-Free In Vitro Maturation of Bovine Oocytes on Subsequent Embryo Development and Cell Allocation in Two Developmental Stages of Day 7 Blastocysts **Reprod. Dom. Anim.** (2008) doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01203.x

LEL, A. C. et al. Role of nitric oxide on quality of freshly ejaculated bull spermatozoa during heparin-induced in vitro capacitation. **Anim. Reprod. Sci.** doi:10.1016/j.anireprosci.2008.12.020

MATTA, S. G. et al. Effect of inhibition of synthesis of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide by aminoguanidine on the in vitro maturation of oocyte-cumulus complexes of cattle. **Anim. Reprod. Sci.** v. 111, p. 189-201, 2008.

OKAWARA, S. et al. Bovine Oocytes and Early Embryos Express mRNA Encoding Glycerol Kinase but Addition of Glycerol to the Culture Media Interferes with Oocyte Maturation, **J. Reprod. Dev.** v. 55, p. 177-82, 2009.

RICART-JANE, D. et al. Anticoagulants and others preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by Griess method. **Nitric Oxide** v. 6, p. 178–185, 2002.

SHIMADA, M. et al. Inhibition of PI 3-kinase or MEK leads to suppression of p34cdc2 kinase activity and meiotic progression beyond the MI stage in porcine oocytes surrounded with cumulus cells. **Biol. Reprod.** v. 65, p. 442–448, 2001.

TAO, Y. et al. Nitric oxide exerts different functions on porcine oocytes cultured in different models, which is affected by beta-mercaptoethanol. **Asian-Austral. J. Anim. Sci.** v. 17, p. 317– 324, 2004.

TAO, Y. et al. Nitric oxide influences the meiotic maturation of porcine oocytes cultured in hypoxanthine-supplemented medium. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.** v. 89, p. 38-44, 2005.

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

TANGHE, S. et al. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Mol. Reprod. Dev.** v. 61, p. 414–424, 2002.

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

YOKOO, M. et al. Influence of hyaluronan accumulation during cumulus expansion on *in vitro* porcine oocyte maturation. **Zygote** v. 16, p. 309–314, 2008.

Tabela 1: Efeito da adição de diferentes concentrações de SNP durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos na expansão das CC em diferentes formas de cultivo

<i>Tratamento/</i>	<i>Óleo</i>			<i>Placa</i>		
	<i>SNP</i>	Controle	10 ⁻⁵ M	10 ⁻³ M	Controle	10 ⁻⁵ M
G1	0 ^b	0 ^b	69,7±10,4 ^a	0 ^b	0 ^b	61,2±7,2 ^a
G2	0 ^b	0 ^b	30,3±10,4 ^a	0 ^b	0 ^b	38,8±7,2 ^a
G3	24,7±19,3 ^b	37±6,3 ^b	0 ^a	13,8±10,1 ^b	12,7±9,8 ^b	0 ^a
G4	75,2±19,3 ^b	63±6,2 ^b	0 ^a	86,3±10,1 ^b	87,3±9,1 ^b	0 ^a

O grau de expansão foi observado 24 h após o período de cultivo. Foi utilizado um sistema de escala subjetivo de 1 a 4 descritos a seguir: grau 1 (G 1) - reposta mínima; grau 2 (G 2) - expansão das camadas externas; grau 3 (G 3)- expansão de todas as camadas, exceto da corona radiata e grau 4 (G 4) - expansão de todas as camadas. ^{a-b}Letras diferentes na mesma linha indicam diferença entre tratamentos (P<0,05). Foram utilizados 30 COC para cada repetição. Os dados são apresentados como média ± SD da percentagem de quatro repetições.

Tabela 2: Integridade das células do *cumulus* de COC cultivados em diferentes formas de cultivo (em gotas cobertas com óleo ou em placas de quatro poços) com adição de diferentes concentrações de SNP

Tratamento	Controle	10 ⁻⁵ M	10 ⁻³ M
Brometo de etídeo negativo (% - CC)			
Óleo	70,2±7,5a	76,1±13,4a	0,75 ± 0,5b
Placa	77,6±11,5a	81,4±8,0a	0,5±0,5b
Iodeto de propídeo negativo (% - oócitos)			
Óleo	91,8±3,1bA	97,2±3,3cA	6,7±2,8aA
Placa	100,0±0,0bB	100,0±0,0bA	19,3±8,1aB

Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença entre os tratamentos (P<0,05).

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença entre tipo de cultivo. Os dados são apresentados como média ± SD de quatro repetições em percentagem.

BE(-) e IP(-) = células com membrana plasmática íntegra (CC e oócito, respectivamente).

Tabela 3: Extrusão do primeiro corpúsculo polar de oócitos cultivados em diferentes formas de cultivo (em gotas cobertas com óleo ou em placas de quatro poços) após a adição de diferentes concentrações de SNP

Tratamento	Óleo (%CP)	Placa (%CP)
Controle	64,6±5,1aA	69,5 ± 7,5aA
SNP(M)		
10 ⁻⁵	67,2±3,1aA	74,5 ± 7aA
10 ⁻³	0,0±0,0bA	0,0 ± 0,0bA

Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os tratamentos e diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença entre as formas de cultivo (P<0,05). Os dados são apresentados como média ± SD de quatro repetições em percentagem. CP = corpúsculo polar.

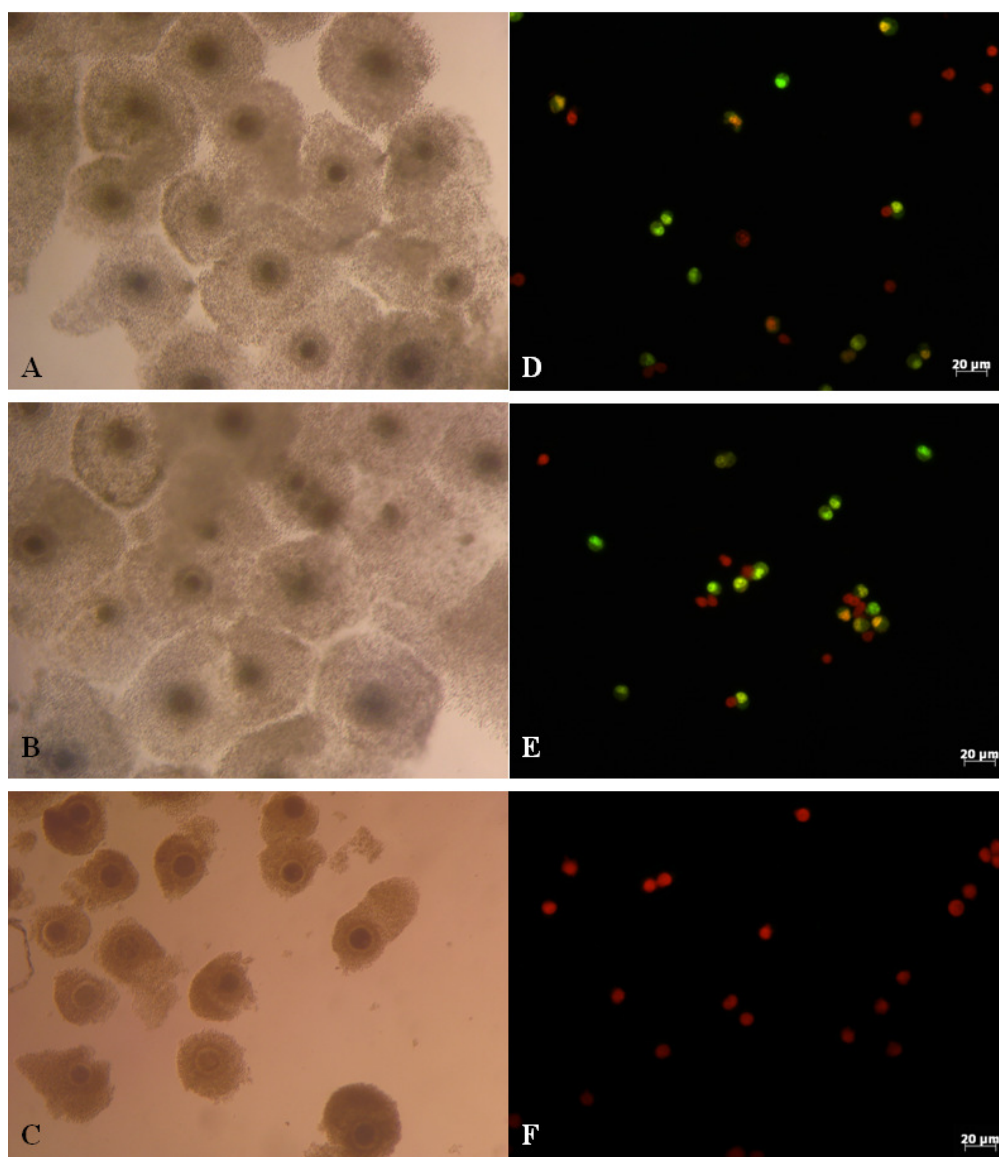


Figura 1: Fotomicrografia representativa da expansão e integridade de membrana das células do *cumulus*. De A a C: Expansão das células do *cumulus* de COC cultivados em 0 (A – controle), 10^{-5} (B) e 10^{-3} M de SNP (C). De D a F: Integridade das células do *cumulus* de COC cultivados na ausência de SNP (D – controle) e após a adição de 10^{-5} (E) e 10^{-3} M de SNP (F). Células marcadas em vermelho (brometo de etídio) indicam células com perda da integridade de membrana e em verde (laranja de acridina) indicam células com membrana íntegra. Células do *cumulus* de cada tratamento mostraram comportamento semelhante nas diferentes formas de cultivo. As CC mostradas são de COC cultivados em placas.

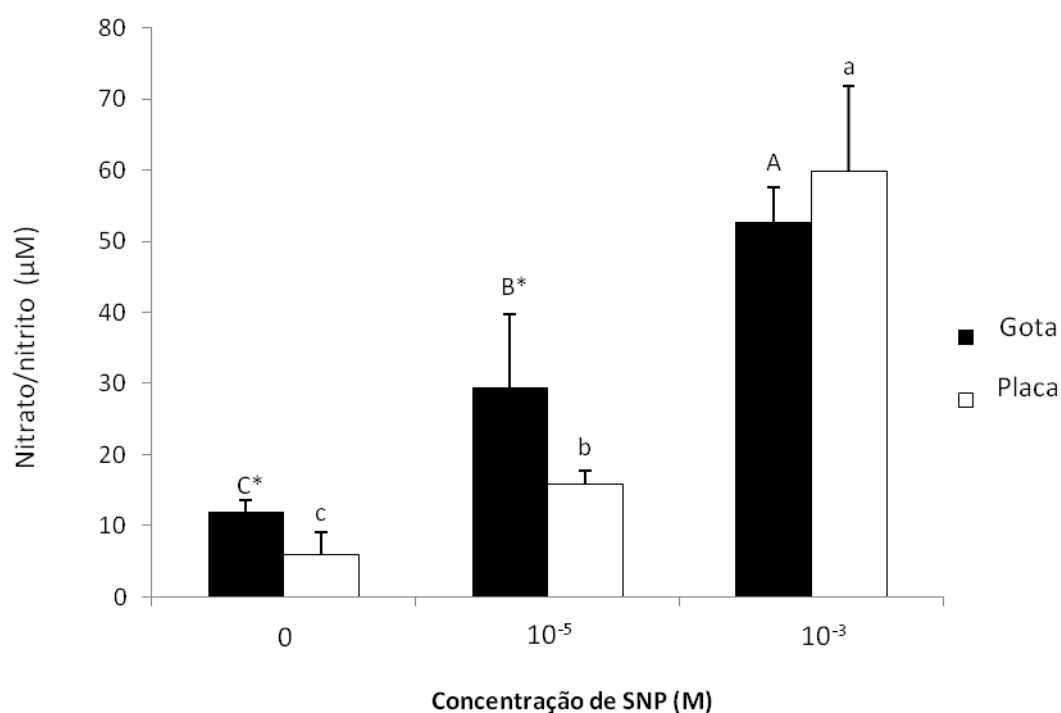


Figura 2: Concentração de NO no meio de maturação *in vitro* de complexos *cumulus*-oócito (n=30) cultivados em gota (150 µL) coberta com óleo mineral e placa de quatro poços (500 µL). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes (A-C) mostram diferença (P<0,05) para cada tratamento cultivado em gota. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes (a-c) mostram diferença (P<0,05) para cada tratamento cultivado em placa. (*) = diferença entre formas de cultivo. Os dados representam a média ± SD de quatro repetições.

Alterações morfológicas e bioquímicas após a adição de diferentes concentrações de NO no meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos e seu reflexo no desenvolvimento embrionário

Viana¹, K.S.; Caldas-Bussiere¹, M.C.; Paes de Carvalho¹, C. S., Dias¹, B.L.; Faes¹ M. R.;
Lanes², V.R.; Quirino¹, C.R.; Escobar², R. C. M.

¹*Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias;* ²*Laboratório de Biologia do Reconhecer, Centro de Biociências e Biotecnologia; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ, 28013-602, Brasil.*

Autor correspondente: kelensv@uenf.br

Resumo

O efeito da adição de diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (SNP; 10^{-5} e 10^{-3} M), doador de óxido nítrico (NO), na maturação *in vitro* de oócitos bovinos foi avaliado após 24 h de cultivo. Os seguintes experimentos foram realizados: 1) avaliação da viabilidade e integridade da membrana oocitária pela coloração com Anexina V/iodeto de propídio e Hoeschst/iodeto de propídio, respectivamente; 2) organização do citoesqueleto e grânulos corticais por imunofluorescência; 3) concentração intra-oocitária de glutatona e concentração de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ pelo método de Griess e 4) desenvolvimento embrionário. No experimento 1, foi observado que a adição de 10^{-5} M de SNP não alterou a viabilidade e integridade da membrana plasmática, porém a adição de 10^{-3} M promoveu perda da viabilidade e integridade da membrana plasmática de todos os oócitos ($P < 0,05$). No experimento 2, foi observada alteração apenas após a adição de 10^{-3} M de SNP, onde não ocorreu a organização do citoesqueleto. A adição de 10^{-5} M aumentou a porcentagem de migração dos grânulos corticais ($P < 0,05$), porém não houve diferença entre o grupo controle e o tratado com 10^{-3} M de SNP ($P > 0,05$). No experimento 3, a concentração de NO no meio de cultivo aumentou à medida que a concentração de SNP adicionada ao meio aumentou ($P < 0,05$) e após a adição de 10^{-3} M de SNP, a concentração de glutatona diminuiu ($P < 0,05$). No experimento 4, foi observado um aumento no número de células totais no embrião eclodido quando se adicionou 10^{-5} M de SNP. Esses resultados mostram que: 1) adição de 10^{-5} M de SNP aumentou a qualidade da maturação oocitária, apresentando uma maior porcentagem de migração de grânulos corticais e número de células embrionárias totais no blastocisto eclodido; 2) a adição de 10^{-3} M de SNP causou um efeito citotóxico, levando à morte celular, porém não alterou a distribuição dos grânulos corticais.

Palavras-chave: oócito, óxido nítrico, citoesqueleto, integridade celular, glutatona, desenvolvimento embrionário

1. Introdução

Maturação *in vitro* (MIV) é uma técnica comumente usada que permite aos oócitos saírem do estágio de vesícula germinativa (VG) e alcançarem a metáfase II (MII). Oócitos maduros podem então ser fertilizados e cultivados *in vitro* até o estágio de blastocisto. Porém, a maturação de oócitos *in vitro* resulta em uma menor porcentagem de mórula e blastocistos quando comparados com aqueles maturados *in vivo* (Lonergan et al., 2003; Peterson e Lee, 2003).

O *status* nuclear e citoplasmático do oócito no momento da fertilização é o maior fator determinante para seu desenvolvimento embrionário. Frequentemente, uma maturação citoplasmática *in vitro* deficiente é refletida em uma baixa habilidade do oócito em formar um pró-núcleo masculino e desenvolver para o estágio de blastocisto após a inseminação *in vitro*. Esta deficiência pode estar relacionada às condições de cultivo (Nagano et al., 2006), podendo ocasionar alterações na progressão da meiose (Sanfins et al., 2004; Liu et al., 2005), organização do fuso (Sanfins et al., 2004; Sanfins et al., 2003) e dos grânulos corticais (Liu et al., 2005; Ducibella et al., 1990), bem como na concentração de glutatona (GSH) (de Matos et al., 1997; Geshi et al., 2000).

O óxido nítrico (NO) é um importante mensageiro inter e intracelular que está envolvido em várias etapas da reprodução em bovinos como esteroidogênese (Faes et al., 2009), sobrevivência folicular, ovulação, fertilização, implantação embrionária (Thaler e Epel, 2003) e maturação oocitária (Matta, et al., 2009, Viana et al., 2007; Schwarz et al., 2008 a, b).

Além da ação como sinalizador, o NO é um gás eletricamente neutro, com baixo peso molecular, o que possibilita atravessar a membrana plasmática por difusão simples, podendo ter ação como radical livre. Ele é rapidamente oxidado para nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), dois metabólitos estáveis (Norman e Cameron, 1996). O NO é sintetizado pela óxido nítrico

sintase (NOS), uma enzima que converte L-arginina em L-citrulina e NO, na presença de oxigênio e vários co-fatores como Ca_2^+ /calmodulina, tetrahydrobiopterina, dinucleotídeo adenina flavina, mononucleotídeo flavina e dinucleotídeo nicotinamida adenina fosfato (Rettori e Mccann, 1998).

Já foi demonstrado que a adição de nitroprussiato de sódio (SNP, 10^{-5} M), um doador de óxido nítrico, no meio de maturação de oócitos bovinos cultivados em gota coberta com óleo, aumenta a percentagem de migração de grânulos corticais e produção de blastocistos *in vitro*, enquanto que a adição de 10^{-3} M inibe a progressão da meiose e expansão das células do *cumulus* (Viana et al., 2007). Estes dados mostram que o NO tem participação em vias tanto de sinalização para aumento da qualidade da maturação, como para a morte celular, dependendo de sua concentração no meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos, como demonstrado em outras espécies (Nakamura et al. 2002; Bu et al. 2003). Schwarz et al. (2008a) também observaram em bovinos uma inibição da maturação nuclear após a adição de alta concentração de s-nitroso-n-acetil-L,l-penicilamina (SNAP), doador de NO no meio de cultivo.

Sendo assim, o presente estudo foi conduzido para investigar alterações morfológicas (viabilidade e integridade da membrana oocitária, organização do citoesqueleto e grânulos corticais) e bioquímicas (concentração intra-oocitária de glutatona e concentração de NO no meio de maturação) após a adição de diferentes concentrações de NO no meio de maturação de oócitos bovinos e seu reflexo no desenvolvimento *in vitro* de embriões, visando determinar a concentração ideal de NO para o meio utilizado na MIV de oócitos bovinos realizada em placa de quatro poços sem a presença de óleo mineral.

Estes dados poderão ser de grande importância na formulação de um meio de maturação *in vitro* que proporcione melhores condições de desenvolvimento embrionário, assim como

no entendimento de enfermidades reprodutivas que levam a uma alteração do ambiente intra-folicular, com posterior alteração da maturação do oócito *in vivo*.

.2. Material e métodos

2.1. Coleta dos ovários e obtenção dos complexos cumulus oócito

Todos os reagentes utilizados foram da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), exceto os mencionados no texto. Ovários de vacas cíclicas em idades variadas foram obtidos semanalmente em abatedouros. Após a coleta, os ovários foram imediatamente colocados em frascos contendo solução salina 0,9% e antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 UI/mL de estreptomicina – Merck, Darmstadt, Germany) em temperatura ambiente (ao redor de 30 °C). Os folículos foram aspirados e os complexos *cumulus*-oócito (COC) foram imediatamente colocados em meio de lavagem (TCM 199-HEPES acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos. A esse meio foi adicionado 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX, 0,5 mM) para manter o bloqueio da meiose durante o período de manipulação dos mesmos. Após a seleção, os COC foram lavados por 4 vezes em gotas de 1000 µL em meio de lavagem sem IBMX antes de serem colocados no meio de maturação. Somente os COC que apresentavam mais de três camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo foram utilizados.

2.2. Maturação in vitro

Oócitos (n=30) selecionados foram transferidos para placas de quatro poços com 500 µL de meio de maturação (TCM 199 suplementado com 10% de SFB, 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin-V, Bioniche, Beleville, Canadá), 5 µg/mL de LH (Lutropin-V, Bioniche, Beleville, Canadá), e antibióticos e mantidos em estufa a 38,5°C, em atmosfera de 5% de

CO₂ em ar. Após o período de maturação (24 h), os COC foram removidos e o meio de cultivo foi coletado e estocado a -20 °C até o dia da dosagem de NO. Foram realizadas 4 repetições para cada tratamento.

2.3. Determinação da viabilidade oocitária

A viabilidade dos oócitos foi determinada utilizando-se a marcação com Anexina V-FITC (Laboratório Amarantes-Mendes, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo-SP, Brasil), uma proteína ligada a um fosfolípido que detecta a translocação do fosfolípido fosfatidilserina do interior para o exterior da membrana citoplasmática, que ocorre durante os estádios iniciais da apoptose. A coloração foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Os oócitos foram lavados em tampão de ligação (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ e 1,8 mM CaCl₂ - pH=7.4) e logo depois colocados em gotas de tampão de ligação contendo anexina V-FITC (1:500) e incubados por 20 min em temperatura ambiente e no escuro. Após o período de incubação, os oócitos foram colocados em solução iodeto de propídio (IP - 100µg/mL em tampão de ligação) para marcação dupla. Em seguida, os oócitos foram lavados duas vezes em gotas de 500µL de tampão de ligação e visualizados com auxílio de um microscópio de epifluorescência (NIKON - Eclipse TE300/TE200, Melville, N.Y., USA)(400x). Os oócitos foram classificados em dois grupos: 1) oócito inviável com núcleo positivo para IP e membrana positiva para Anexina-V, o qual indica perda da viabilidade celular e 2) oócito viável com núcleo negativo para IP e membrana negativa para Anexina-V.

2.4. Determinação da integridade da membrana plasmática oocitária

Após o período de maturação, os oócitos foram desnudos e expostos ao Hoescht 33258 (10 mg/mL) por 5 min e após este período, ao IP (10 µg/mL) por 5 min para observação da

integridade celular. Os oócitos foram colocados entre lâmina e lamínula com glicerol e observados individualmente com auxílio do microscópio (NIKON - Eclipse TE300/TE200, Melville, N.Y., USA)(400x). Os oócitos foram divididos em dois grupos: 1) com membrana íntegra, apresentando núcleo corado em azul (marcado com Hoescht) e 2) com perda da integridade da membrana plasmática, apresentando núcleo corado em vermelho (marcado com IP)

2.5. Determinação da organização dos microtúbulos e microfilamentos

Para avaliação da formação dos microtúbulos, foi utilizada imunofluorescência com anticorpo monoclonal específico. Os oócitos foram desnudados e fixados em 3,7% de paraformaldeído (P6148), mais 0,6% Triton X-100 (USB, 9002-93-1) em PBS (livre de cálcio e magnésio) com 0,1% de álcool polivinílico (PVA – P8136) por 30 min; lavados por três vezes em PBS com 0,1% de PVA (PP); bloqueados com 3% de soro de cabra (Invitrogen, 16210-064) em PP por 45 min. Os oócitos foram incubados com anticorpo anti-alfa tubulina conjugada com FITC (F2168) (1:100) em PP por 1 h e depois marcados com 10 µg/mL de iodeto de propídio (P4170) em PP por 15 min; lavados por três vezes em PP e montados entre lâmina e lamínula com glicerol (USB, 56-81-5) para a avaliação em microscópio de epifluorescência (1000x).

Para avaliação dos microfilamentos, os oócitos foram desnudados e fixados em 3,7% de paraformaldeído, mais 0,6% Triton X-100 em PP por 30 min; lavados por três vezes em PP; marcados com 1 µg/mL de rodamina/faloidina (Invitrogen, R415), mais 10µg/mL de Hoechst 3342 em PP por 30 min; lavados por três vezes em PP e montados entre lâmina e lamínula com glicerol para a avaliação em microscópio de epifluorescência (1000x).

2.6. Determinação da migração dos grânulos corticais

Para a determinação da migração dos grânulos corticais (GC), foi utilizado o método de YOSHIDA et al. (1993). Após o período de maturação, os oócitos foram desnudados mecanicamente e em seguida, colocados em solução de protease 5% em PBS a 39°C até que ocorresse a semi-dissolução da zona pelúcida, que foi posteriormente removida mecanicamente em meio TCM 199-HEPES suplementado com 10% de SFB. Livres da zona pelúcida, os oócitos foram lavados 3 vezes em solução de bloqueio-SB (PBS + 0,1% BSA + 0,75% glicina) e fixados em solução de 2% de paraformaldeído em temperatura ambiente por 30 min. Os oócitos foram então lavados três vezes em SB por 5 min cada, permeabilizados em solução de Triton X-100 (0,1%) por 5 min e lavados novamente três vezes em SB. Em seguida, os oócitos foram incubados em solução bloqueio contendo 0,0025% de *Leucoculinales-FITC* (L-9262) a 37 °C por 30 min no escuro e foram então lavados duas vezes em SB por 5 min. A montagem das lâminas foi feita utilizando um meio de montagem (glicerol/TRIS suplementado com 0,5% de n-propil galato) para a visualização dos grânulos corticais. De acordo com o padrão de distribuição dos grânulos corticais, os oócitos foram classificados em três grupos: 1) GC distribuídos em grupos sem apresentar nenhuma migração– oócito imaturo; 2) GC dispersos no ooplasma e parcialmente em grupos – oócito parcialmente maturo e 3) GC periféricos apresentando migração total para a região cortical – oócito maturo, de acordo com HOSOE e SHIOYA (1996).

2.7. Mensuração da concentração de glutathiona oocitária

Todos os passos e preparo de soluções foram conduzidos de acordo com as instruções do *kit* de ensaio para glutathiona (CS0260), e a concentração de glutathiona foi quantificada pelo ensaio de reciclagem do ácido glutathiona disulfido dithionitrobenzóico (DTNB-GSSG) (Funashi et al., 1994). Para analisar o conteúdo intra-oocitário de glutathiona, os oócitos foram

desnudados e lavados em PBS contendo 1 mg/ml de PVA, por três vezes. Grupos de 25 oócitos maturados foram lavados e transferidos para um microtubo contendo tampão de ensaio (0,2 M de tampão fosfato de sódio, contendo 10 mM EDTA, pH 7,2) com volume final de 5 µL. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas até o dia do ensaio. No dia do ensaio cada microtubo foi congelado e descongelado sucessivamente por três vezes. A curva contendo 0,5 a 0,0312 nmoL em 10µL foi preparada em solução de ácido 5-sulfosalicílico 5% (SSA), simultaneamente com as amostras. Um volume de 10µL de cada amostra e curva foi adicionado em placas de 96 poços. A mistura de trabalho foi preparada no dia do ensaio com 1,5mg/mL de DTNB, 6U/mL de GSH redutase em solução tampão do ensaio. Além da mistura de trabalho foi também pipetado 0,16mg/mL de NADPH em cada poço. A placa foi analisada em leitor ELISA (Multiscan, Lab Systems, Melbourne, Austrália) a 405nm. O conteúdo de glutatona nas amostras foi calculado a partir da curva padrão e pela divisão do conteúdo total da amostra pelo número de oócitos presente em cada amostra.

2.8. Mensuração da concentração de nitrato/nitrito

A concentração de nitrato/nitrito ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$), metabólitos estáveis do NO, foi determinada pelo método baseado na reação colorimétrica de Griess (RICART-JANE et al., 2002). O reagente de Griess é composto de uma mistura de sulfanilamida 2% e N-(1-naphthyl) ethylene-diamine 0,2% em água deionizada. A primeira reação na amostra ocorre com o nitrito para formar o sal diazonium que reage com o segundo reagente para formar a cor púrpura com um pico de absorvância a 540 nm. Para reduzir o nitrato a nitrito, as amostras (40 µL) foram incubadas com uma mistura contendo 1000µL da enzima nitrato redutase (100µL da enzima 10 UI diluída em água deionizada + 900 µL de água deionizada) oriunda de bactéria, 1000 µL do co-fator NADPH (5mg/mL) diluído em água deionizada, 1000 µl de tampão fosfato de potássio (0,5 M). Em seguida, as amostras foram incubadas a

37°C por 14-16 h em placa de 96 poços. Posteriormente, 80µL do reagente de Griess foram adicionados às amostras. Todas as soluções foram protegidas da luz desde a preparação até o ensaio. A curva padrão de nitrito de sódio foi diluída em meio de maturação contendo valores de 0,5 a 100µM. As análises foram realizadas em espectofotômetro (Multiskan EX Primary EIA V 2.1-0). Com os valores da absorbância foi montado um gráfico de dispersão. A relação entre a absorbância e concentração de nitrato/nitrito foi linear ($R^2=0,98$; $P<0,05$).

2.9. Fecundação e cultivo *in vitro*

Para a fecundação *in vitro* foi utilizado sêmen congelado de um mesmo touro da raça Nelore e de uma mesma partida (ABS-Pecplan, G-7601). A seleção dos espermatozóides para a fertilização *in vitro* (FIV) foi feita segundo a técnica de gradiente de Percoll (Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Sweden). Em um tubo cônico, foram adicionados 1mL de Percoll 90% e em seguida, 1mL de Percoll 45%. O sêmen foi descongelado a uma temperatura de 36-37°C e, em seguida, adicionado na porção superior do gradiente de Percoll e centrifugado por 10 min a 650 x g. Após a retirada do sobrenadante, uma nova centrifugação de 4 min a 200 x g com aproximadamente 5 mL de TALP-sp com BSA foi realizada para remover o excedente do Percoll.

Após a maturação, grupos de 30 oócitos foram lavados (3x) em meio de fertilização e transferidos para gotas de 150 µL de meio de fertilização sob óleo mineral em placa de Petri (35x10mm, Corning Inc. Acton, MA, USA). Os oócitos foram incubados com espermatozóides (2×10^6 /mL) por 18h, a 39°C, em atmosfera de 5% de CO₂. O meio de fecundação *in vitro* utilizado foi o TALP-fecundação (TALP-fec) suplementado com 6 mg/mL de BSA livre de ácidos graxos, 2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina, 250 mM de epinefrina e heparina a 1%. Após o período de fertilização, os supostos zigotos foram lavados (3x) em meio de lavagem para remoção das células do *cumulus* e espermatozóides e,

em seguida, transferidos para gotas de 100 μ L de meio de cultivo (TCM 199 suplementado com 10% de SFB e antibióticos mencionados acima) (20 oócitos por gota) sob óleo mineral, onde foram mantidos por 9 dias, a 39°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Foi realizada a avaliação da clivagem (D2) e do desenvolvimento embrionário (D7, D8 e D9).

2.10. *Contagem de células de blastocistos eclodidos*

Blastocistos eclodidos dos diferentes grupos foram colocados entre lâmina e lamínula e fixados por 24 a 48 h em etanol/ácido acético (3:1) (Merk, Rio de Janeiro, Brazil), corados com orceína acética 2% e observados com auxílio de microscópio de contraste de fase da marca NIKON (Eclipse TE300/TE200, Melville, N.Y., USA) (400x) para contagem do número de células.

2.11. *Experimentos*

Foram avaliados os efeitos de diferentes concentrações de SNP (0, 10⁻⁵ e 10⁻³ M – Viana et al. 2007) na maturação de oócitos bovinos *in vitro* avaliando-se diferentes parâmetros.

2.11.1. *Experimento 1: Efeito do SNP na viabilidade e integridade oocitária*

Oócitos tratados com 0, 10⁻⁵ e 10⁻³ M de SNP após 24 h de cultivo foram submetidos à coloração com Anexina V para determinar a viabilidade celular e com hoescth/iodeto de propídio para avaliação da integridade da membrana citoplasmática.

2.11.2. *Experimento 2: Efeito do SNP na dinâmica dos microtúbulos, microfilamentos e distribuição dos grânulos corticais*

Os oócitos foram cultivados em meio de maturação contendo 0, 10^{-5} e 10^{-3} M de SNP por 24 h. A distribuição dos microtúbulos, microfilamentos e estágio de maturação nuclear foram avaliados após esse período. Oócitos tratados com 0, 10^{-5} e 10^{-3} M de SNP após 24 h de cultivo foram fixados para avaliação da migração dos grânulos corticais.

2.11.3. Experimento 3: Efeito do SNP na concentração intra-oocitária de GSH e na concentração final de NO no meio de cultivo

Oócitos tratados com 0, 10^{-5} e 10^{-3} M de SNP após 24 h de cultivo foram utilizados para avaliação da concentração intra-celular de glutathione (GSH), utilizando o *kit* de dosagem Glutathione assay kit (CS0260). Foi realizada dosagem da concentração de NO no meio de maturação pelo método de Griess.

2.11.4. Experimento 4: Efeito do SNP no desenvolvimento embrionário in vitro

Os oócitos foram cultivados em meio de maturação contendo 0, 10^{-5} e 10^{-3} M de SNP por 22 h, sendo fertilizados após este período e mantidos no mesmo meio (TALP-fec) por 18h e cultivados por 9 dias (D9) *in vitro*. Clivagem, desenvolvimento de blastocistos, taxa de eclosão e número total de células em embriões eclodidos foram determinados.

2.12. Análise estatística

Todos os oócitos foram distribuídos ao acaso dentro de cada grupo experimental e cada experimento foi repetido quatro vezes. Os dados foram avaliados usando o SAS (Statistical Analysis System, Cary, NC, USA) pela análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste *t*, a 5% de probabilidade.

3. Resultados

3.1 Experimento 1

A adição de 10^{-3} M de SNP causou morte celular em todos os oócitos (100% dos oócitos) como demonstrado pela coloração com Anexina V e iodeto positivos após a maturação (Tabela 1), diferindo do grupo controle e 10^{-5} M de SNP ($P < 0,05$). Esses dados foram confirmados com a coloração hoescht/IP, onde a maior parte dos oócitos tratados com 10^{-3} M de SNP (80,7%) se apresentou positivo para IP ($P < 0,05$) (Figura 1).

3.2. Experimento 2

A marcação dos microtúbulos foi observada em todos os oócitos tratados com 0 (controle) e 10^{-5} M de SNP (ver Fig. 3, A e B para imagens representativas). Nenhuma alteração no fuso e placa metafásica foi observada. Porém, a adição de 10^{-3} M de SNP fez com que o fuso dos microtúbulos fosse completamente despolimerizado e os cromossomos hipercondensados e aglutinados em uma massa (Fig. 3, C).

A emissão do primeiro corpúsculo polar (PB1) foi inibida ($P < 0,05$) pela adição de 10^{-3} M de SNP (Figura 4), ocorrendo em $72,6 \pm 8,7\%$ dos oócitos do grupo controle (0) e $80,2 \pm 6,0\%$ do grupo tratado com 10^{-5} M de SNP após 24 h de maturação ($P < 0,05$).

Com relação aos microfilamentos, no grupo controle e 10^{-5} M de SNP, uma maior marcação foi observada abaixo do córtex celular e próximo ao PB1 após 24 h de maturação (ver Fig. 3, D e E para imagens representativas). Nenhuma alteração na disposição dos microfilamentos foi observada. Diferentemente, a adição de 10^{-3} M de SNP alterou a disposição dos microfilamentos que se apresentaram em grumos (clusters), e não abaixo do córtex.

Em 68,20% dos oócitos maturados com 10^{-3} M de SNP, pode-se observar a migração dos grânulos corticais para a periferia do citoplasma (distribuição periférica; ver Fig. 5A para

imagem representativa). Esse resultado não diferiu do grupo controle (72,25% periféricos) ($P>0,05$). Entretanto, o grupo 10^{-5} M de SNP apresentou uma maior migração dos grânulos corticais ($P<0,05$), com 86,83% dos oócitos com GC periféricos (tabela 2).

3.3. Experimento 3:

A concentração intracelular de GSH foi menor ($P<0,05$) em oócitos maturados com 10^{-3} M de SNP (4,4 pmol) do que em oócitos do grupo controle (5,4 pmol) (Figura 6). Entretanto, a concentração de GSH do grupo 10^{-5} M de SNP (5,5 pmol), se manteve semelhante ao controle ($P>0,05$) (Figura 6).

A concentração de NO no meio de maturação foi semelhante entre o grupo controle e o 10^{-5} M de SNP (6 ± 3 e $15,8\pm 1,9$ μM , respectivamente). Porém, a adição de 10^{-3} M de SNP aumentou ao redor de 10 vezes a concentração de NO no meio de maturação ($59,9\pm 12$ μM), diferindo dos outros tratamentos (Figura 2, $P<0,05$).

3.4. Experimento 4:

Foi avaliado o efeito da adição de diferentes concentrações de SNP no meio de maturação no desenvolvimento embrionário *in vitro* (Tabela 3). A taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário foram semelhantes entre os oócitos fertilizados oriundos do grupo controle e do tratado com 10^{-5} M de SNP (75,95% e 83,23% de clivagem; 37,73% e 44,05% de blastocisto, respectivamente) ($P>0,05$), porém a concentração de 10^{-5} M de SNP aumentou o número de células totais no embrião quando comparado ao controle ($256,8\pm 52,5$ e $196,9\pm 54,0$, respectivamente – $P<0,05$). Oócitos submetidos a maturação com 10^{-3} M de SNP não clivaram (0%) ($P<0,05$) e conseqüentemente, o desenvolvimento embrionário não foi observado.

4. Discussão

Estudos prévios demonstraram que concentração adequada de óxido nítrico deve estar presente no meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos para que ocorra uma eficiente maturação nuclear e citoplasmática (Viana et al., 2007; Schwarz et al., 2008 a,b; Matta et al., 2009). Esses achados aumentaram o conhecimento sobre a necessidade do NO durante a maturação *in vitro*. Porém, ainda não haviam sido demonstradas, além da progressão da meiose, quais alterações morfológicas e bioquímicas que ocorrem no oócito após a adição de diferentes concentrações de NO no meio de maturação *in vitro*.

No presente experimento demonstrou-se que a adição de 10^{-5} M de SNP não alterou a viabilidade e integridade da membrana plasmática do oócito. Contudo, a adição de 10^{-3} M de SNP causou perda da viabilidade celular e da integridade da membrana plasmática. O fato da membrana plasmática ter sido marcada com anexina V no presente experimento, não permite afirmar que a morte celular se iniciou pelo processo de apoptose induzida (Li et al., 2008), pois se ocorreu a lesão da membrana, como mostrado pela coloração com iodeto de propídeo, esta permitiu a entrada da anexina V e sua ligação com a fosfatidilserina sem ter sido necessária a exposição da mesma. Assim, devido ao fato de 19,6 % dos oócitos tratados com 10^{-3} M de SNP terem apresentado membrana íntegra e cromossomos condensados, não pode descartar a hipótese da morte celular ter ocorrido por necrose secundária à apoptose. Já foi demonstrado que o NO induz apoptose e/ou necrose em ovários de fêmeas de camundongos (Ellman et al., 1993), em células endometriais de humanos (Li et al., 2001) e em embriões bovinos (Orsi, 2006), mas não em oócitos maturados *in vitro*.

Não foi observada diferença na organização do citoesqueleto após a adição de 10^{-5} M de SNP no meio de maturação em relação ao controle. Os oócitos maturados na presença de 10^{-3} M de SNP apresentaram ausência de polimerização dos microtúbulos e desorganização

dos filamentos de actina, o que deve ter ocorrido em decorrência à perda da viabilidade e integridade da membrana plasmática do oócito.

A adição de 10^{-5} M de SNP aumentou a taxa de migração dos grânulos corticais em relação ao controle e 10^{-3} M de SNP. Esses dados corroboram com os observados por Viana et al. (2007), onde a adição de 10^{-5} M de SNP melhorou tanto a migração dos GC quanto a taxa de blastocisto. No presente estudo, não houve aumento da taxa de produção de blastocistos, mas houve aumento na qualidade do embrião avaliada pelo número de células totais. Estes resultados mostram que a adição de NO nesta concentração durante a maturação *in vitro* teve um reflexo no ciclo celular dos blastocistos eclodidos avaliados no D9. Resultados semelhantes foram obtidos por Traiser et al (2002), que observaram que o NO em baixa concentração promove a entrada na fase M durante o desenvolvimento neuroepitelial de embriões de galinhas.

Schwarz et al. (2008a) não observaram diferença na taxa de blastocisto nem no número de células totais presente no embrião ao utilizarem uma concentração intermediária de NO (10^{-5} M de SNAP, doador de NO). Viana et al. (2007) observaram um aumento na taxa de blastocisto quando a mesma concentração de um outro tipo de doador de NO, SNP, foi utilizada. Diferenças na composição do meio de maturação utilizado por Schwarz et al. (2008a) em relação ao utilizado por Viana et al (2007) e no presente experimento, como a presença de piruvato, podem ter sido a causa dos primeiros autores não terem observado ação do NO no aumento do número de embriões ou número de células totais embrionárias. Além disso, a utilização de placa de quatro poços sem o uso de óleo mineral neste experimento, pode ter auxiliado na ação do NO no ciclo celular (aumento do número total de células embrionárias), protegendo o meio do estresse oxidativo que ocorre na presença do óleo (Otsuki et al, 2007). Outra diferença no sistema de cultivo que poderia explicar o fato do NO não ter aumentado a taxa de blastocistos neste experimento, como observado por Viana et al

(2007) seria uma maior relação de volume de meio de maturação/oócito (1 oócito/16,7 μ L de meio) em relação ao utilizado por Viana et al (2007 – 1 oócito /5 μ L de meio) favorecendo as condições de cultivo do grupo controle.

Uma das alterações citoplasmáticas que ocorrem durante a maturação é a migração e redistribuição de organelas como os GC, que estão localizadas no córtex de oócitos maturados que não foram fertilizados (Cran e Esper, 1990; Liu et al., 2005). A liberação do seu conteúdo por exocitose no espaço perivitelino bloqueia a polispermia (Abeydeer et al., 2000), além de liberar proteínas necessárias para a pré-implantação de embriões em desenvolvimento (Hoodbhoy et al. 2001). Apesar de não ter sido observada uma relação entre taxa de migração de grânulos corticais e produção de blastocisto no presente experimento, mas sim no número de células totais embrionárias, a adição de 10^{-5} M de SNP pode ter influenciado no acúmulo de moléculas específicas, ainda não identificadas, que preparam o oócito para eventos pós-fertilização (Sirard et al, 2006), as quais poderiam estar melhorando a cinética do ciclo celular durante o início do desenvolvimento embrionário. Mais estudos são necessários para se identificar as moléculas encontradas nos grânulos corticais de bovinos e qual sua relação com o número e qualidade de embriões produzidos *in vitro*

Diferente do esperado, a adição de 10^{-3} M de SNP não apresentou diferença em relação a migração dos GC observada no grupo controle. Matta et al. (2009) observaram uma inibição da migração dos grânulos corticais após a adição de aminoguanidina, inibidor da síntese de NO pela enzima óxido nítrico sintase induzível, no meio de maturação, demonstrando que o NO atua diretamente no controle da migração dos GC. Os dados do presente experimento sugerem que tenha havido uma aceleração da migração dos GC devido ao estresse oxidativo promovido pela alta concentração de NO no meio de cultivo, ocorrendo

assim, antes que o citoesqueleto apresentasse desorganização (Wessel et al., 2002) e que ocorresse a perda da integridade da membrana plasmática do oócito.

Resultados obtidos por Viana et al. (2007), levaram a sugerir que a adição de uma concentração intermediária (10^{-5} M) de SNP no meio de maturação melhora a qualidade dos oócitos maturados estimulando a síntese de glutathiona (GSH) (Kuo et al., 1996). Para testar esta hipótese, foi realizada a mensuração da concentração de GSH intra-oocitária após a maturação *in vitro* na presença de diferentes concentrações de SNP (10^{-5} e 10^{-3} M).

Mesmo não tendo sido observada diferença na concentração de GSH intra-oocitária em oócitos do grupo controle e maturados na presença de 10^{-5} M de SNP, a adição de NO pode estar atuando em uma via diferenciada da síntese de GSH (Kuo et al., 1996), que tenha ação antioxidante.

A adição de 10^{-3} M de SNP diminuiu a concentração de GSH intra-oocitária neste experimento. Brad et al. (2003) observaram uma diminuição das concentração de GSH em oócitos maturados *in vitro* em relação aos maturados *in vivo*, em decorrência do maior estresse oxidativo que ocorre no cultivo *in vitro* devido à maior tensão de O_2 . Bustamante et al., (2000) demonstraram que alta concentração de NO tem ação pró-apoptótica, causando a liberação do citocromo c e a diminuição da concentração de glutathiona, dando início ao processo apoptótico, podendo ser este um dos mecanismos que levou a morte dos oócitos tratados com 10^{-3} M de SNP no presente experimento.

Esses resultados mostram que: 1) adição de 10^{-5} M de SNP aumentou a qualidade da maturação oocitária, levando a uma maior percentagem de migração de grânulos corticais e número de células embrionárias totais no blastocisto eclodido, por uma via diferente da que envolve a glutathiona; 2) a adição de 10^{-3} M de SNP causou um efeito citotóxico, ocasionando a morte celular com perda da viabilidade e integridade da membrana plasmática, ausência da maturação nuclear e organização do citoesqueleto e diminuição da concentração intra-

oocitária da glutatona e 3) oócitos maturados na presença de 10^{-3} M de SNP não apresentaram alteração na migração dos grânulos corticais, sugerindo que o NO tenha antecipado este processo como resposta ao estresse oxidativo ocasionado pela alta concentração de NO no meio de cultivo, antes que o citoesqueleto tivesse sido desorganizado ou houvesse perda da integridade da membrana plasmática.

Agradecimentos

Esse trabalho foi financiado pela FAPERJ (E-26/171.059/2005). K.S. Viana recebeu bolsa de doutorado da CAPES.

5. Referências

- Abeydeera, L.R., Wang, W.H., Cantley, T.C., Rieke, A., Murphy, C.N., Prather, R.S., Day, B.N., 2000. Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology* 54, 787–797.
- Brad, A.M., Bormann, C.L., Swain, J.E., Durkin, R.E., Johnson, A.E, Clifford AL, 2003. Glutathione and adenosine triphosphate content of in vivo and in vitro matured porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 64, 492-498.
- Bu, S.; Xia, G.; Tao, Y.; Lei, L.; Zhou, B., 2003. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. *Mol. Cell. Endocr.* 207, 21-30.
- Bustamante, J.; Bersier, G.; Romero, M.; Badin, R.A.; Boveris, A. 2000. Nitric oxide production and mitochondrial dysfunction during rat thymocyte apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 376:239-247.

- Cran, D.G., Esper, C.R., 1990. Cortical granules and the cortical reaction in mammals. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 42: 177-188.
- de Matos DG, Furnus CC, Moses DF., 1997. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod*; 57:1420–5.
- Ducibella T, Kurasawa S, Rangarajan S, Kopf GS, Schultz RM., 1990. Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucida. *Dev Biol*; 137:46–55.
- Ducibella, T., Buetow, J., 1994. Competence to undergo normal, fertilization-induced cortical activation develops aftermetaphase I of meiosis in mouse oocytes. *Dev. Biol.* 165, 95–104.
- Eiserich, J. P.; Estevez, A. G.; Bamberg, T. V.; Ye, Y. Z.; Chumley, P. H.; Beckman, J. S.; Freeman, B. A. 1999 Microtubule dysfunction by posttranslational nitrotyrosination of α -tubulin: A nitric oxide-dependent mechanism of cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 6365–6370.
- Ellman, C., Corbett, J.A., Misko, T.P., McDaniel, M., Beckerman, K.P., 1993. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced cellular cytotoxicity in rat ovary: potential role for nitric oxide in the ovulatory process. *J. Clin. Invest.* 92, 3053–3056.
- Espey, M.G.; Miranda, K.M.; Feelisch, M. (2000) Mechanisms of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress. *Ann. New York Acad. Sci.* 899:209-221.
- Faes, M. R.; Caldas-Bussiere, M. C.; Viana, K. S.; Dias, B. L.; Costa, F. R.; Escocard, R. M., 2009. Nitric oxide regulates steroid synthesis by bovine antral granulosa cells in a chemically defined medium. *Anim. Reprod. Sci.*; 110: 222-236.
- Funahashi H, Cantley T, Stumpf T, Terlouw S, Day B. 1994 Use of low-salt culture medium for in vitro maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocyte glutathione

- levels and enhanced male pronuclear formation after *in vitro* fertilization. *Biol Reprod*;51:633–9.
- Furnus, C.C.; de Matos, D.G.; Picco, S.; Peral Garc'ía, P.; Inda, A.M.; Mattioli, G.; Errecalde, A.L. 2008 Metabolic requirements associated with GSH synthesis during *in vitro* maturation of cattle oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 109: 88–99.
- Gasparri B, Boccia L, Marchandise J, Di Palo R, George F, Donnay I, et al. Enrichment of *in vitro* maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology* 2006;65:275–87.
- Geshi M, Takenouchi N, Yamauchi N, Nagai T., 2000. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biol Reprod*;63:1730–4.
- Herbette, S., Lenne, C., Leblanc, N., Julien, J.L., Drevet, J.R., Roeckel-Drevet, P., 2002. Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. *Eur. J. Biochem.* 269, 2414–2420.
- Herrick, J.R., Brad, A.M., Krisher, R.L., 2006. Chemical manipulation of glucose metabolism in porcine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation *in vitro*. *Reproduction* 131, 289–298.
- Hoodbhoy, T., Dandekar, P., Calarco, P., Talbot, P., 2001. p62/p56 are cortical granule proteins that contribute to formation of the cortical granule envelope and play a role in mammalian preimplantation. *Mol. Reprod. Dev.* 59, 78–89.
- Kim, N.H., Cho, S.K., Choi, S.H., Kim, E.Y., Park, S.P., Lim, J.H., 2000. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes *in vitro* maturation. *Zygote* 8, 25–32.

- Kim, N.H.; Funahashi, H.; Prather, R.S.; Schatten, G.; Day, B.N. (1996) Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 43: 248-255.
- Krisler RL, Bavister BD. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* 1998;49:103–14.
- Kuo, P.C., Abe, K.Y., Schroeder, R.A., 1996. Interleukin-1-induced nitric oxide production modulates glutathione synthesis in cultured rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 271, 851-862.
- Lafleur, M.V.M., Hoorweg, J.J., Joenje, H., Westmijze, E.J., Retel, J., 1994. The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against single oxygen. *Free Radical Res.* 21, 9–17.
- Li, H.Y., Chang, S.P., Yuan, C.C., Chao, H.T., 2001. Nitric oxide induces apoptosis in endometrial epithelial cells in the presence of progesterone: involvement of mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Hum. Reprod.* 7, 755–763.
- Li HJ, Liu DJ, Cang M, Wang LM, Jin MZ, Ma YZ, Shorgan B. 2008 Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Anim Reprod Sci.* Oct 8 doi:10.1016/j.anireprosci.2008.09.018.
- Liu, X.Y., Mal, S.F., Miao, D.Q., Liu, D.J., Bao, S., Tan, J.H., 2005. Cortical granules behave differently in mouse oocytes matured under different conditions. *Hum. Reprod.* 20, 3402–3413.
- Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Fair, T., Boland, M.P., 2003. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. Domest. Anim.* 38, 259–267.
- Luciano AM, Modina S, Gandolfi F, Lauria A, Armstrong DT. 2000 Effect of cell-to-cell contact on in vitro deoxyribonucleic acid synthesis and apoptosis responses of bovine

- granulosa cells to insulin-like growth factor-I and epidermal growth factor. *Biol Reprod.* 2000 Dec;63(6):1580-5.
- Ma, W.; Koch, J. A.; Viveiros, M. M. 2008 (MTOC)-associated proteins and participates in meiotic spindle organization. *Develop. Biol.* 320: 414–425
- Matta, S. G. C.; Bussiere, M. C. C.; Viana, K. S.; Faes, M. R.; Paes De Carvalho, C. S.; Dias, B. L.; Quirino, C. R., 2009. Effect of inhibition of synthesis of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide by aminoguanidine on the in vitro maturation of oocyte-cumulus complexes of cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 111, 189-201.
- Meister, A., Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711–760.
- Miyara, F., Migne, C., Dumont-Hassan, M., LeMeur, A., Cohen-Bacrie, P., Aubriot, F.X., Glissant, A., Nathan, C., Douard, S., Stanovici, A., Debey, P., 2003b. Chromatin configuration and transcriptional control in human and mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 64, 458–470.
- Nagano, M., Katagiri, S., Takahashi, Y., 2006. Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential *Zygote* 14: 53–61.
- Nakamura, Y., Yamagata, Y., Sugino, N., Takayama, H., Kato, H., 2002. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biol. Reprod.* 67, 1588–1592.
- Nisoli E, E. Clementi, C. Tonello, C. Sciorati, L. Briscini & M. O. Carruba: Effects of nitric oxide on proliferation and differentiation of rat brown adipocytes in primary cultures. *Br. J Pharmacol.* 125, 888-894 (1998)
- Nisoli E, S. Falcone, C. Tonello, V. Cozzi, L. Palomba, M. Fiorani, A. Pisconti, S. Brunelli, A. Cardile, M. Francolini, O. Cantoni, M. O. Carruba, S. Moncada & E. Clementi: Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101, 16507-16512 (2004)
- Norman, J.E.; Cameron, I.T., 1996 Nitric oxide in the human uterus. *Rev. Reprod.* 1,61-68.

- O'Flaherty, C. M.; Beorlegui, N. B.; Beconi, M. T. (1999) Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology* 52:289–301.
- Orsi, N.M., 2006. Embryotoxicity of the nitric oxide donor sodium nitroprusside in preimplantation bovine embryos in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 91, 225–236.
- Otsuki, J. et al. 2007 Peroxidation of mineral oil used in droplet culture is detrimental to fertilization and embryo development. *Fertil. Steril.* 88, 741–743.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F., 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta* 333 (1), 19–39.
- Peterson, A.J., Lee, R.S., 2003. Improving successful pregnancies after embryo transfer. *Theriogenology* 59, 687–697.
- Rettori, V.; Mccann, S.M., 1998. Role of nitric oxide and alcohol on gonadotropin release *in vitro* and *in vivo*. *NY Acad. Sci.* 840, 185-193.
- Ricart-Jan E, D. et al. Anticoagulants and others preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by Griess method. *Nitric Oxide* 6: 178–185, 2002.
- Riley, J. C.; Behrman, H. R. (1991) Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 198:781–91.
- Roth, Z.; Hansen, P.J. (2005) Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal events in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction* 129: 235-244.
- Sanfins A, Lee GY, Plancha CE, Overstrom EW, Albertini DF., 2003. Distinctions in meiotic spindle structure and assembly during in vitro and in vivo maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod*; 69: 2059–67.

- Sanfins A, Plancha CE, Overstrom EW, Albertini DF., 2004. Meiotic spindle morphogenesis in in vivo and in vitro matured mouse oocytes: insights into the relationship between nuclear and cytoplasmic quality. *Hum Reprod* 19:2889–99.
- Schuh, M., Ellenberg, J., 2007. Self-organization of MTOCs replaces centrosome function during acentrosomal spindle assembly in live mouse oocytes. *Cell* 130, 484–498.
- Schwarz, K. R. L.; Pires, P. R. L.; Adona, P. R.; Câmara De Bem, T. H.; Leal, C. L. V., 2008a. Influence of nitric oxide during maturation on bovine oocyte meiosis and embryo development *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.* 20, 529–536
- Schwarz, K. R. L., Pires, P.R.L., de Bem, T.H.C., Adona, P.R., Leal, C.L.V., 2008b Consequences of nitric oxide synthase inhibition during bovine oocyte maturation on meiosis and embryo development. *Reprod Dom Anim* doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01242.x
- Sirard, M-A., Richard, F., Blondin, P., Robert, C., 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65: 126-136.
- Shimizu, T. 1997 Reorganization of the cortical actin cytoskeleton during maturation division in the Tubifex egg: possible involvement of protein kinase C. *Dev. Biol.* 188: 110–121.
- Stojkovic, M.; Machado, S. A.; Stojkovic, P.; Zakhartchenko, V.; Hutzler, P.; Gonçalves, P. B. (2001) Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol. Reprod.* 64:904–9.
- Sun, Q.Y.; Schatten, H. (2006) Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction* 131: 193-205.
- Sun, Q.Y.; Wu, G.M.; Lai, L.; Park, K.W.; Cabot, R.; Cheong, H.T.; Day, B.N.; Prather, R.S.; Schatten, H. (2001) Translocation of active mitochondria during pig oocyte

- maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction* 122:155-163.
- Tao, Y.; Xia, G.L.; Bu, S.M.; Zhou, B.; Zhang, M.J.; Wang, F.C. (2004). Nitric oxide exerts different functions on porcine oocytes cultured in different models, which is affected by beta-mercaptoethanol. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.* 17: 317– 24.
- Thaler, C.D.; Epel, D., 2003. Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: a little dab'll do ya. *Curr. Pharmac. Des.* 9, 399-409.
- Traister, A., Abashidze, S., Gold, V., Plachta, N., Karchovsky, E., Patel, K., Weil, M., 2002 Evidence That Nitric Oxide Regulates Cell-Cycle Progression in the Developing Chick Neuroepithelium *Dev. Dynam.* 225, 271–276.
- Valdez, L.B.; Lores Arnaiz, S.; Bustamante, J.; Alvarez, S.; Costa, L.E.; Boveris, A. (2000) Free radical chemistry in biological systems. *Biol. Res.* 33:65-70.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 44–84.
- Viana, K. S.; Caldas-Bussiere, M. C.; Matta, S.G.C.; Faes, M.R.; Paes de Carvalho, C.S.; Quirino, C.R., 2007. Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 102, 217-227
- Viveiros, M.M., Hirao, Y., Eppig, J.J., 2001. Evidence that protein kinase C (PKC) participates in the meiosis I to meiosis II transition in mouse oocytes. *Dev. Biol.* 235, 330–342.
- Viveiros, M.M., O'brien, M., Eppig, J.J., 2004. Protein kinase C activity regulates the onset of anaphase I in mouse oocytes. *Biol. Reprod.* 71, 1525–1532.

Yoshida, M., Cran, D.G., Pursel, V.G., 1993. Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 36, 462–468.

Tabela 1: Viabilidade e integridade da membrana plasmática de oócitos bovinos maturados *in vitro* (24 h) após a adição de diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (SNP).

Tratamento	Oócitos (n)	Anexina V/IP positivos (%)	Oócitos (n)	Hoescht/IP positivos (%)
Controle	100	0 ^b	86	0 ^b
SNP				
10 ⁻⁵ M	99	0 ^b	98	0 ^b
10 ⁻³ M	124	100 ^a	102	80,7±8,1 ^a

Valores com diferentes letras (a, b) na mesma coluna são significativamente diferentes (P<0,05). Os dados são apresentados como média±S.E.M de quatro repetições. Anexina V/IP positivos = perda da viabilidade; Hoescht/IP positivos = perda da integridade da membrana plasmática.

Tabela 2: Distribuição dos grânulos corticais de oócitos bovinos maturados *in vitro* (24 h) em meio contendo diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (SNP).

Tratamento	N	Migração dos grânulos corticais (%)	
		Total	Parcial ^b
Controle	83	72,3 ± 9,9 ^b	27,8 ± 9,9 ^b
SNP			
10 ⁻⁵ M	86	86,8 ± 6,0 ^a	13,2 ± 6,0 ^a
10 ⁻³ M	62	68,2 ± 7,9 ^b	31,8 ± 7,9 ^b

Valores com diferentes letras (a, b) na mesma linha são significativamente diferentes (P<0,05). Os dados são apresentados como média±S.E.M de quatro repetições

Tabela 3: Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos fertilizados *in vitro* após maturação em meio suplementado com diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (SNP)

Tratamento	Oócitos (n)	Desenvolvimento embrionário			
		CL n (%±s.e.m.)	BL/D8 n (%±s.e.m.)	Ec/D9 n (%±s.e.m.)	N células Ec/D9 (média ±s.e.m.)
Controle	114	87(76,0±5,2) a	43(37,7±3,1) a	29(25,38±7,3) ^a	196,9±54,0 ^b
SNP					
10 ⁻⁵ M	117	97(83,2±2,8) a	52(44,1±6,9) a	30(25,50±9,3) ^a	256,8±52,5 ^a
10 ⁻³ M	120	0 ^b	0 ^b	0 ^b	-

Valores com diferentes letras (a, b) dentro das colunas são significativamente diferentes (P<0,05). CL: clivagem; BL/D8: proporção de blastocistos desenvolvidos após 8 dias de cultivo *in vitro*; Ec/D9: proporção de embriões eclodidos após 9 dias de cultivo *in vitro*; N células: número total de células de blastocistos eclodidos em D9. Os dados são apresentados como média±S.E.M de quatro repetições.

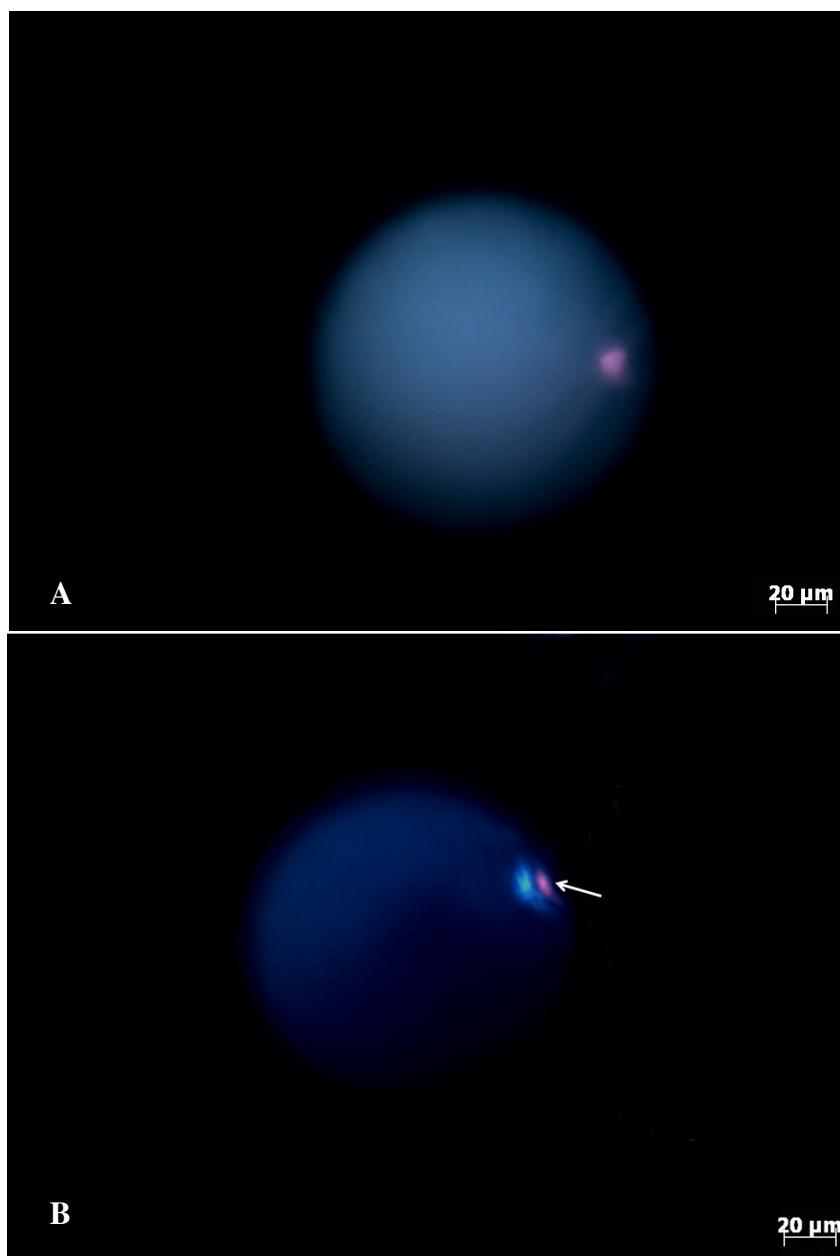


Figura 1: Fotografias representativas da integridade da membrana plasmática dos oócitos bovinos cultivados com diferentes concentrações de nitroprussiado de sódio (SNP). A – oócito cultivado em 10^{-3} M de SNP e B – oócito cultivado com 0 M de SNP (controle). Cromatina marcada em azul indica membrana plasmática íntegra (hoescht) e cromatina marcada em vermelho indica lesão de membrana plasmática (iodeto de propídio). A seta indica a presença do corpúsculo polar.

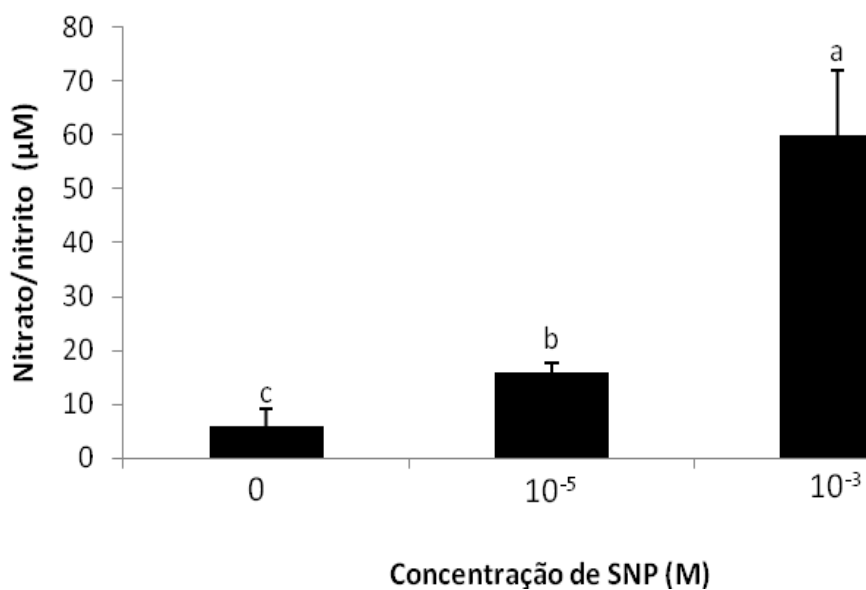


Figura 2: Concentração de nitrato/nitrito no meio de maturação *in vitro* de complexos *cumulus*-oócito após a adição de diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (SNP). ^{a-c}Diferentes letras indicam diferença significativa entre tratamentos ($P < 0,05$). Dados são apresentados como média \pm S.E.M de quatro repetições.

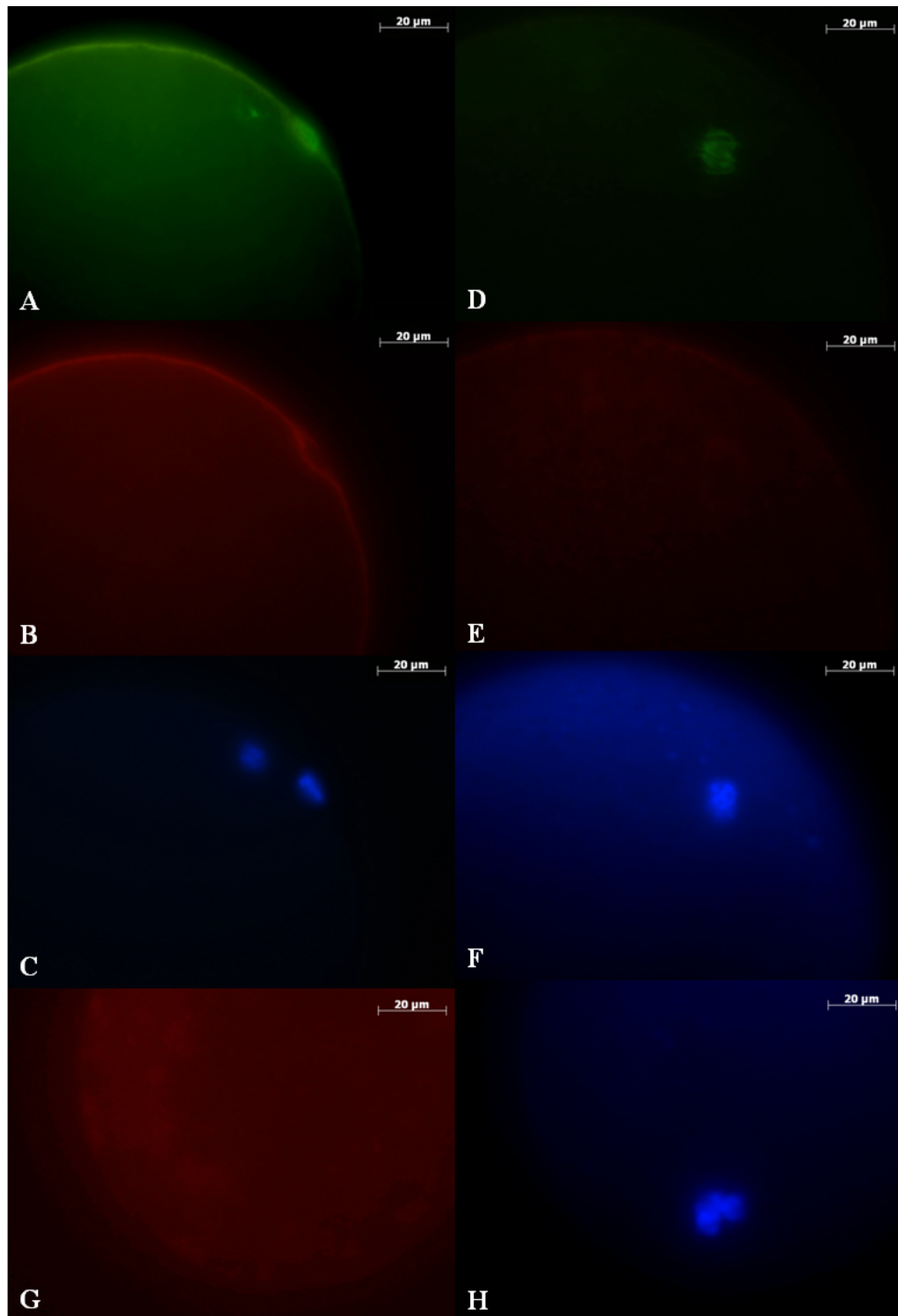


Figura 3: Fotomicrografias representativas de oócitos bovinos expostos a 0 (controle) e 10^{-3} M de nitroprussiato de sódio (SNP) avaliados quanto à dinâmica nuclear, de microtúbulos e dos microfilamentos. A-F: controle e G-H: 10^{-3} M de SNP. Categorias de oócitos encontradas: de A a C - oócito em metáfase II com microtúbulos evidentes tanto no citoplasma do oócito quanto no corpúsculo polar; de D a F - oócito em metáfase I com microtúbulos evidentes no mesmo local; G e H - oócito com cromatina compacta, ausência de microtúbulos e filamentos em grumos (*clusters*). Material nuclear em azul (Hoescht), microtúbulos em verde (FITC) e microfilamentos em vermelho (rodamina).

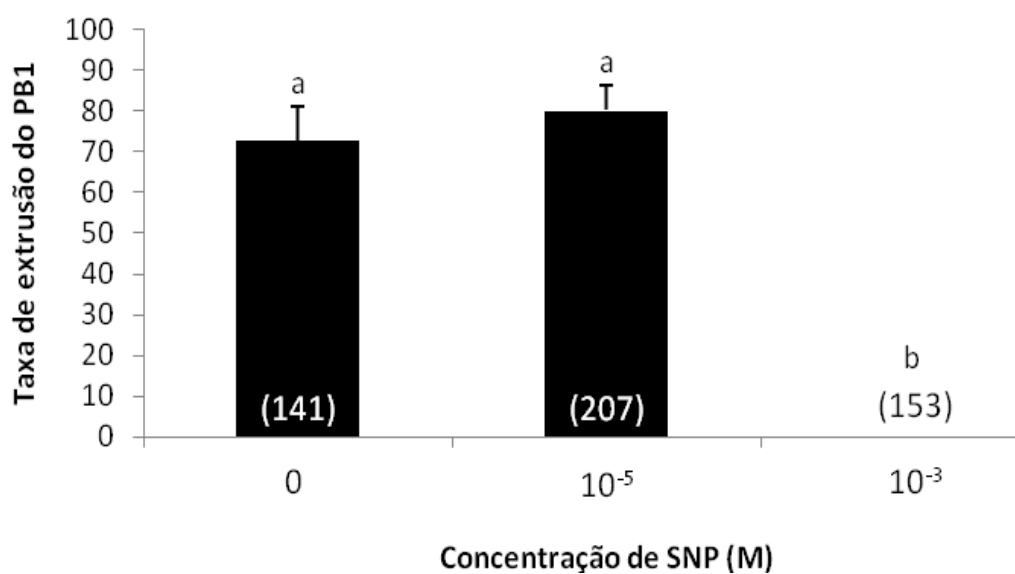


Figura 4: Efeito da adição de diferentes concentrações de SNP (0, 10^{-5} e 10^{-3} M) no meio de maturação na percentagem de extrusão do PB1. ^{a-b}Diferentes letras indicam diferença significativa entre tratamentos ($P < 0,05$). Números entre parênteses indicam o número total de oócitos examinados. Dados são apresentados como média \pm S.E.M de quatro repetições em percentagem

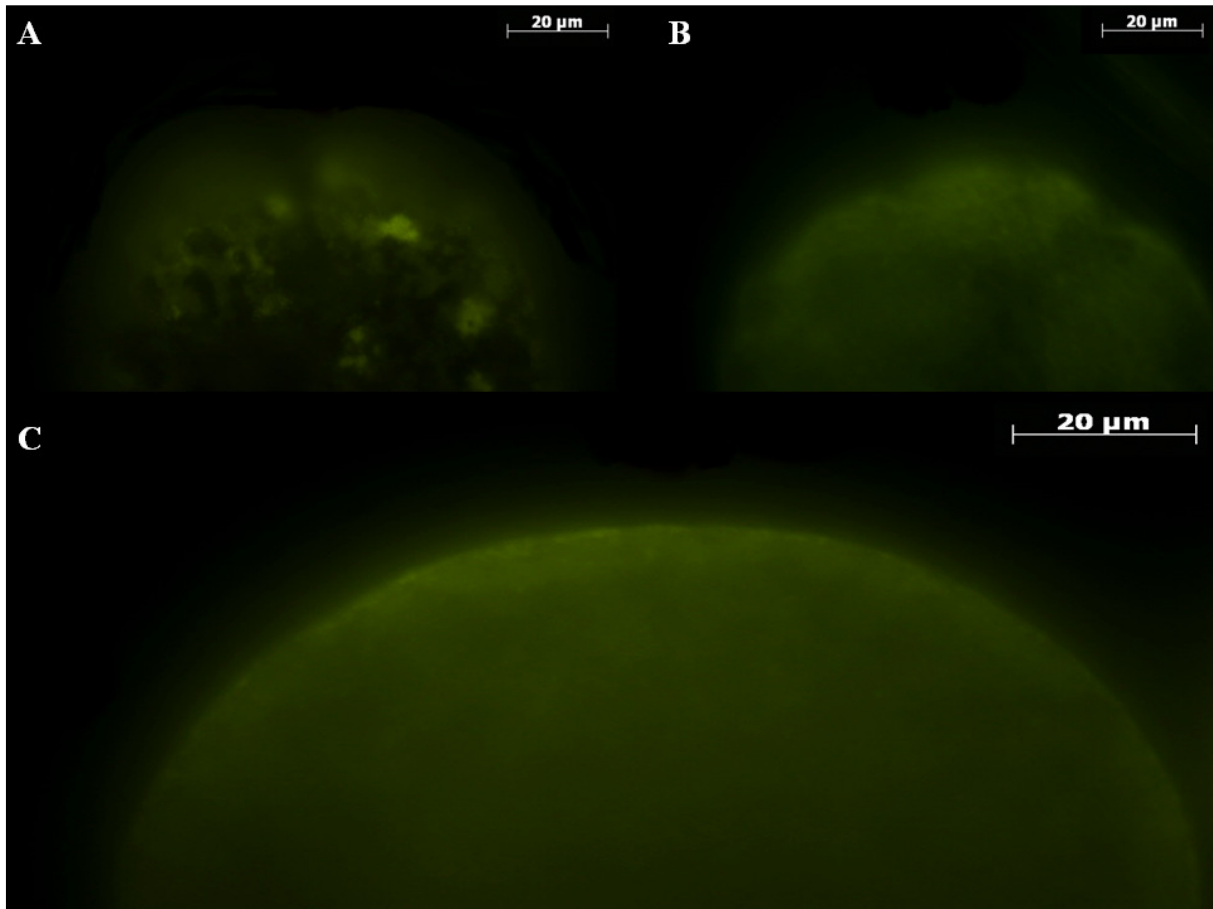


Figura 5: Dinâmica da distribuição dos grânulos corticais marcados com *Lens culinares*-FITC. A - oócito imaturo com GC distribuídos em grupos (dispersos), B - oócito parcialmente maturo com GC periféricos e em grupos (e dispersos) e; C - oócito maturo com GC periféricos.

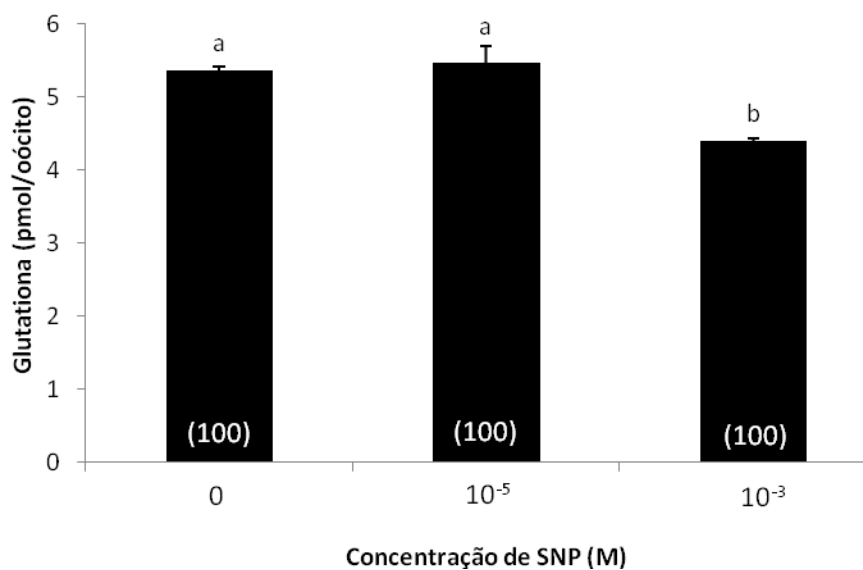


Figura 6: Concentração de glutathiona em oócitos bovinos maturados na presença de 0, 10^{-5} e 10^{-3} M de SNP. Colunas sem letra igual são diferentes ($P < 0,05$). ^{a-b}Diferentes letras indicam diferença significativa entre tratamentos ($P < 0,05$). Números entre parênteses indicam o número total de oócitos examinados. Dados são apresentados como média \pm S.E.M de quatro repetições. (aumentar a letra do título do eixo x e y e não colocar em 3D, para ficar pronto para a publicação)

**APÊNDICE – Protocolos das metodologias utilizadas no desenvolvimento dos
trabalhos**

I) ESTOQUES

Meios para MIV, FIV e CIV

1) Penicilamina/estreptomicina

			Volume
H ₂ O		100 mL	20,0 mL
Penicilina (100UI/mL)	Sigma/P-7794	6,1 g	1,22 g
Estreptomicina (100µg/mL)	Sigma/S-9137	5,0 g	1,0 g
Filtrar e estocar no freezer (validade seis meses)			

2) Gentamicina sulfato

			Volume
NaCl 0,9%			10,0 mL
Gentamicina (10 mg/mL)	Sigma/G-1272		0,1 g
Filtrar e estocar no freezer (validade seis meses)			

3) LH

Diluição em TCM-199	Lutropin-v BIONICHE		5,0 µg/mL
Filtrar e estocar no freezer (validade seis meses)			

4) FSH

Diluição em TCM-199	Folltropin-v		0,5 µg/mL
Filtrar e estocar no freezer (validade seis meses)			

5) Ácido pirúvico

H ₂ O		3,0 mL	9,0 mL
Piruvato	Sigma/P-5280	0,33 g	2,97 g
Filtrar e estocar no freezer (validade seis meses)			

6) Solução Salina			
H ₂ O		10 mL	100 mL
NaCl (0,9%)	Gibco	0,09 g	0,9 g
Filtrar e estocar na geladeira por duas semanas			

7) Hipotaurina			
NaCl 0,9%		5,0 mL	10,0 mL
Hipotaurina	Sigma/ H-1384	0,545 mg	1,09 mg
Filtrar, fazer alíquotas e estocar no freezer (validade seis meses)			

8) Epinefrina			
H ₂ O			50 mL
Ácido láctico			165mg=130µL
Metabissulfito (Na ₂ S ₂ O ₅)	Sigma/S-9000		50 mg
Retirar 40 mL e acrescentar a epinefrina			
Epinefrina	Sigma/E-4250		1,83 mg
Filtrar e estocar no freezer (proteger da luz)			

9) Penicilamina			
NaCl 0,9%		5,0 mL	10,0 mL
Penicilamina	Sigma/P-5280	15 mg	0,003 mg
Filtrar e fazer alíquotas			

10) Heparina			
NaCl 0,9%		5,0 mL	10 mL
Heparina	Sigma/H-1304	0,005g	0,010 g
Filtrar e estocar no freezer (validade seis meses)			

11) PHE (Proteger da luz)

NaCl (0,9%)		40 μ L
Penicilamina	2 mM	25 μ L
Hipotaurina	1 mM	25 μ L
Epinefrina	250 mM	10 μ L

12) TALP-SP Estoque

H ₂ O	(Concentração mM)	50 mL
NaCl	Gibco 100	0,292 g
NaH ₂ PO ₄	Sigma/S-0751 0,29	0,00175 g
KCl	Sigma/P-5405 3,1	0,0115 g
Ac. Lático siruposo 98%	Sigma/L-4263 0,112	95 μ L
Hepes	Gibco 10	0,119 g
NaHCO ₃	Sigma/S-6297 25	0,105 g
Phenol Red	Sigma/P-5530 0,028	0,0005 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma/C-3881 2,1	0,0155 g
MgCl ₂ +6H ₂ O	Sigma/M-0250 0,4	0,004 g
Piruvato	Sigma/P-4562 0,05	0,0055 g
P/S	Estoque	5 μ L
Retirar 5 mL e adicionar BSA (com ácido graxo)		
pH: \pm 7,3. Filtrar e estocar na geladeira por duas semanas. mOsm. \pm 285		

13) TALP-SP (10X)			
H ₂ O		(Concentração mM)	50 mL
NaCl	Gibco	924	0,584 g
NaH ₂ PO ₄	Sigma/S-0751	04	0,0048 g
KCl	Sigma/P-5405	31	0,0232 g
Ac. Lático siruposo 98%	Sigma/L-4263	0,27	230 µL
Hepes	Gibco	100	0,238 g
NaHCO ₃	Sigma/S-6297	250	0,21 g
Phenol Red	Sigma/P-5530	0,028	0,001 g
MgCl ₂ +6H ₂ O	Sigma/M-0250	15,2	0,008 g
Piruvato	Sigma/P-4562	10	0,011 g
P/S	Estoque		10 µL
pH: ±7,3. Filtrar e estocar na geladeira por duas semanas. mOsm. ± 285			

14) TALP-FEC Estoque			
H ₂ O		(Concentração mM)	50 mL
NaCl	Gibco	114	0,333 g
NaH ₂ PO ₄	Sigma/S-0751	0,4	0,002 g
NaHCO ₃	Sigma/S-6297	2,4	0,105 g
KCl	Sigma/P-5405	3,1	0,012 g
MgCl ₂ +6H ₂ O	Sigma/M-0250	0,5	0,005 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma/C-3881	2,0	0,015 g
Ac. Lático siruposo 98%	Sigma/L-4263		72 µL
Phenol Red	Sigma/P-5530		0,001 g
Piruvato	Sigma/P-4562	0,01	0,0011 g
P/S	Estoque		50 µL
Retirar 3 mL e adicionar BSA (livre de ácido graxo)			
pH: ±7,8. Filtrar e estocar na geladeira por duas semanas. mOsm. ± 285			

II) MEIOS DE ROTINA (MIV, FIV e CIV)

15) Meio de manipulação de oócitos

	Volume
TCM-199/Hepes	9,750 mL
P/S	10 µL
Soro (5% SFB)	250 µL
Para uso diário	

16) MIV final

	Volume
TCM-199	3,700 mL
FSH (0,5µg/mL)	30 µL
LH (5,0 µg/mL)	30 µL
P/S	3 µL
Soro (10% SFB)	300 µL
Para uso diário	

17) Talp SP Uso

		Volume
Talp-sp estoque		5 mL
BSA fração V	0,006 g/mL	0,03 g
Piruvato	0,05 mM	15 µL
P/S	100 UI/mL	5 µL
Para uso diário. Proteger da luz. Fazer gotas em placa 35 X 100 mm de 100 µL e cobrir com óleo mineral.		

18) Talp-Fec Uso	
	Volume
Talp-Fec estoque	3 mL
BSA livre de ácido graxo	0,018 g
Piruvato	9 μ L
P/S	3 μ L
Para uso diário. Proteger da luz. Fazer gotas em placa 35 X 100 mm de 100 μ L e cobrir com óleo mineral.	

19) FIV final	
	Volume
Talp-Fec Uso	1350 μ L
PHE	60 μ L
Heparina	30 μ L
Para uso diário. Proteger da luz. Fazer gotas em placa 35 X 100 mm de 100 μ L e cobrir com óleo mineral.	

20) CIV final	
	Volume
TCM-199	1,800 mL
P/S	2 μ L
Soro (10% SFB)	200 μ L
Para uso diário	

21) Preparação do Percoll 90%		
Percoll comercial	Marca	1,350 mL
Talp SP 10x		150 μ L

22) Preparação do Percoll 45%		
Percoll 90%	Nutricell	500 μ L
Talp SP		500 μ L
Colocar o percoll 90% em um tubo e, em seguida adicionar o 45% lentamente – Estabilizar por uma hora		

23) Preparação do sêmen

- Descongelar o sêmen 37°C por 30 segundos;
- Adicionar lentamente o sêmen na parte superior do gradiente
- Centrifugar a por 10 minutos
- Retirar o sobrenadante com cuidado e adicionar 4 mL de TALP-sp sobre o pellet;
- Centrifugar novamente a por 2 minutos
- Retirar o sobrenadante, fazer a concentração e a fecundação.

24) Cálculo para concentração de espermatoóides (sptz)

- Preparar um microtubo com 190 µL de água
- Retira-se uma amostra de 10 µL de sptz para concentração
- Homogeneizar bem
- Fazer a contagem de sptz na câmara de Neubauer
- Contar 5 quadrantes de cada lado da câmara
- Somar o número de sptz contados nos dois lados da câmara e fazer a média
- Fazer cálculos – $CI.VI = CF.VF$
- CI = concentração inicial - n° de sptz contado na câmara (média ex. ~46)
- VI = volume inicial
- CF = concentração final sptz/mL utilizado na fecundação ($2,0 \times 10^6$ sptz/mL)
- VF = volume final – volume da gota de FIV (Ex. gota de 100µL)
- Fazer os cálculos para saber o volume a ser usado na FIV
- Exemplo: $VI = CF . VF \Rightarrow VI = 2,0.10^6 . 100$
 $CI \qquad \qquad \sim 46.10^6$
- VI = ~4,3 µL → volume de sptz utilizado para inseminação dos oócitos

25) MEIOS PARA COLORAÇÃO

26) Solução de PBS

pH – 7,4 filtrar e estocar na geladeira (validade dois meses)		Volume
NaCl	8 g	0,8 g
KCl	0,2 g	0,02 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g	0,115 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g	0,02 g
H ₂ O	1000 mL	100

27) Solução de Bloqueio (SB – Grânulos corticais)

	Volume
PBS	15 mL
BSA (com ácido graxo)	0,015 g
Glicina	0,1125 g

28) Tampão de ligação (Anexina-V)

pH – 7,4 filtrar e estocar na geladeira (validade dois meses)		Volume
PBS		50 mL
Hepes	10 mM	0,13 g
NaCl	150 mM	0,438 g
KCl	5 mM	0,018 g
MgCl ₂	1 mM	0,004g
CaCl ₂	1,8 mM	0,01 g

29) Solução estoque de Hoescht (10mg/mL) e Iodeto de Propídio (10µg/mL)

	Volume
Hoescht	25 mg
H ₂ O deionizada	2,5 mL
Iodeto de propídio	0,1 mg
H ₂ O deionizada	1 mL

30) Solução estoque de Laranja de Acridina e Brometo de Etídio (1mg/mL)

	Volume
Laranja de acridina	100µg
H ₂ O deionizada	1 mL
Brometo de Etídio	100µg
H ₂ O deionizada	1 mL

31) Solução estoque de nitrito de sódio

	Volume
NaNO ₂ (S-3421)	0,0344 g
H ₂ O deionizada	5 mL

32) Solução nitrito de sódio 100 mM

	Volume
NaNO ₂ (estoque)	10 µL
TCM-199	990 µL

27) Solução nitrito de sódio 10 mM

	Volume
NaNO ₂ (100 mM)	10 µL
TCM-199	90 L

28) Solução nitrito de sódio 1 mM	
	Volume
NaNO ₂ (10 mM)	10 µL
TCM-199	90 L

29) Curva padrão (nitrito/nitrato)		
Concentração (µM)	1 mM de nitrito (µL)	Meio MIV (µL)
0	0	1000
1	1	999
5	5	995
10	10	990
25	25	975
50	50	950
75	75	925
100	100	900

Fazer alíquotas de 1 mL, congelar e armazenar.

30) Soluções (nitrito/nitrato)		
		Volume
1)	NADPH (N-1630)	25 mg
	H ₂ O deionizada	5 mL
2)	Nitrato Redutase (N-7265)	10 UI
	H ₂ O deionizada	500 µL
3)	KH ₂ PO ₄	6,805 g
	H ₂ O deionizada	100 mL
Preparo do coquetel		
	NADPH	1000 µL
	KH ₂ PO ₄	1000 µL
	Nitrato Redutase diluída (100 µL em 900 µL de H ₂ O)	1000 µL
	H ₂ O deionizada	1000
		L

31) Corante de Griess

		Volume
H ₃ PO ₄ (5%)		
	H ₃ PO ₄	2,5 mL
	H ₂ O deionizada	50 mL
Solução A		
	Sulfalamida	0,5 mg
	H ₃ PO ₄ (5%)	25 µL
Solução B		
	NEED 1%	0,05 g
	H ₂ O deionizada	25 mL
2 mL da solução A + 2 mL da solução B + 2 mL de H ₃ PO ₄ (5%) + 2 mL de H ₂ O deionizada		

32) Coloração dos Grânulos corticais

- 1- Desnudar os oócitos mecanicamente em PBS + 1% de SFB;
- 2- Remoção da zona pelúcida: Protease 5%;
- 3- Lavar em TCM + 10% SFB (3 x 5 min);
- 4- Lavar em SB (3 x 5 min);
- 5- Fixação: PBS + 3% de paraformaldeído (PFD - 30 min);
- 6- Lavar em SB (3 x 5 min);
- 7- Permeabilização: SB + 0,1% de Triton X-100 (5 min);
- 8- Lavar em SB (3 x 5 min);
- 9- Coloração: SB com 1µg/mL de *Lens culinares* (30 min na estufa);
- 10- Lavar em SB (2 x 5 min);
- 11- Montagem das lâminas com glicerol;
- 12- Visualização em microscópio de epifluorescência.

33) Coloração do citoesqueleto (microtúbulos)

- 1- Solução PP: PBS + 0,1% PVA;
- 2- Desnudar os oócitos em PP;
- 3- Fixação: PBS com 3% de PFD + 0,6% de Triton X-100 (30 min);

- 4- Bloqueio: PP com 3% de oro de cabra (45 min);
- 5- Coloração: PP com α -Tubulina conjugada com FITC (1:100) (1 h);
- 6- Coloração: PP com 10 $\mu\text{g/mL}$ de Iodeto de propídio (15 min);
- 7- Lavar os oócitos 3 vezes em PP;
- 8- Montagem das lâminas em glicerol;
- 9- Visualização em microscópio de epifluorescência.

34) Coloração do citoesqueleto (microfilamento)

- 1- Solução PP: PBS + 0,1% PVA;
- 2- Desnudar os oócitos em PP;
- 3- Fixação: PBS com 3% de PFD + 0,6% de Triton X-100 (30 min);
- 4- Coloração: PP com 1 $\mu\text{g/mL}$ Faloidina/rodamina (30 min);
- 5- Coloração: PP com 10 $\mu\text{g/mL}$ Hoescht (5 min);
- 6- Lavar os oócitos 3 vezes em PP;
- 7- Montagem das lâminas em glicerol;
- 8- Visualização em microscópio de epifluorescência.

35) Coloração com Anexina V

- 1- Solução PP: PBS + 0,1% PVA;
- 2- Desnudar os oócitos em PP;
- 3- Lavar os oócitos em solução tampão;
- 4- Coloração: Anexina V 1:500 no escuro (20 min);
- 5- Lavar em solução tampão;
- 6- Coloração: PP com 10 $\mu\text{g/mL}$ de Iodeto de propídio (15 min);
- 7- Montagem das lâminas em glicerol;
- 8- Visualização em microscópio de epifluorescência.

36) Mensuração da Glutaciona

- 1- Solução PP: PBS + 0,1% PVA;
- 2- Desnudar os oócitos em PP;
- 3- 25 oócitos em 5 μL de Buffer Assay 1x (A-5103);
- 4- Congelar em nitrogênio líquido e armazenar;
- 5- No dia do ensaio, descongelar e adicionar 15 μL de 5% SSA (S-2130);

- 6- Congelar e descongelar 3 x (nitrogênio líquido para congelar e água a 37°C para descongelar);
- 7- Pipetar 10µL de cada amostra em placa de 96 poços;
- 8- Adicionar 150 µL da mistura de trabalho em cada poço;
- 9- Adicionar 50 µL de NADPH (N-6505) em cada poço;
- 10- Fazer análise em leitor ELISA.

37) Mensuração do nitrito/nitrato

- 1- Pipetar 160 µL de branco (somente meio de maturação);
- 2- Pipetar 40 µL da curva e das amostras na placa de 96 poços;
- 3- Pipetar 40 µL do coquetel nos poços, menos no branco;
- 4- Deixar a placa à 37 °C overnight para que ocorra a reação ($\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$);
- 5- NO dia seguinte, colocar 80 µL do corante Griess;
- 6- Fazer análise em leitor ELISA em 540 nM.

38) Coloração com LA e BE

- 1- Diluir 500µL da solução estoque de LA em 500µL da solução estoque de BE (1:1);
- 2- Diluir 10µL da solução 1:1 de LA/BE em 90µL de PP, chegando a concentração final de 5µg/mL;
- 3- Desnudar os COC em PBS + 5% SFB;
- 4- Centrifugar as CC;
- 5- Retirar o sobrenadante;
- 6- Adicionar 30µL de LA/BE ao pellet formado;
- 7- Montar entre lâmina e lamínula.

39) Coloração de Hoescht/IP

- 1- Diluir 3 μ L da solução estoque de Hoescht em 997 μ L de PP (10mg/mL);
- 2- Desnudar os COC em PP e lavar;
- 3- Coloração: Hoescht (10mg/mL) por 5 minutos;
- 4- Coloração: IP (10 μ g/mL) por 5 minutos;
- 5- Lavar os oócitos em PP;
- 6- Montar entre lâmina e lamínula.