

**EFEITO DA ADIÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NA MATURAÇÃO *IN*  
*VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS**

**KELEN SALAROLI VIANA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MARÇO – 2005

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**EFEITO DA ADIÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS**

**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 Mestre em Produção Animal.”**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Clara Caldas Bussiere

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MARÇO – 2005**

# **EFETIO DA ADIÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS**

**KELEN SALAROLI VIANA**

**Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.**

Aprovada em 31 de março de 2005

## **Comissão Examinadora:**

---

Prof<sup>a</sup>. Cláudia Lima Verde Leal (Doutora, Reprodução Animal) – FZEA-USP

---

Prof. Reginaldo da Silva Fontes (Doutor, Reprodução Animal) – UENF

---

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

---

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

“Mas os que esperam no Senhor renovarão as suas forças. Subirão com asas como águias; correrão e não se cansarão, caminharão e não se fadigarão.”

Isaías 40:31

Ao

meu pai e a minha mãe por todo  
apoio e carinho

Ao

meu marido Walker por sempre  
estar ao meu lado

Aos

meus irmãos Kíssila e Raulisson por  
ficarem felizes com minha vitória

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me dar a vida e a capacidade de realizar este estudo.

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) pelo oferecimento deste curso.

A CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

A minha orientadora por me ensinar e orientar de forma brilhante e por além de ser orientadora ser uma amiga. Obrigada.

Ao professor Angelo José Burla Dias pelo apoio e colaborações de grande importância.

Ao professor Reginaldo da Silva Fontes por sempre estar disposto a ajudar.

A professora Cláudia Lima Verde Leal por seu apoio e ensinamentos.

A professora Célia Raquel Quirino pela orientação nas análises estatísticas.

De maneira uniforme, gostaria de agradecer a Sílvia Matta, Márcia Faes e Carla Sobrinho pela ajuda a todo momento e disposição. Sem vocês a conclusão deste trabalho seria impossível. Muito obrigada!

Aos amigos pós-graduandos Amanda, Lio, Adolfo, Filipe, Janaína, Vanessa, Roseane e José Leonardo pela amizade e carinho.

Aos bolsistas do laboratório pela organização do material utilizado e pela companhia.

A todos os membros da Coordenação de Pós-Graduação Animal pela boa vontade de ajudar.

As funcionárias da biblioteca do CCTA pela boa vontade prestada.

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a conclusão deste estudo, o meu muito obrigada!



## **BIOGRAFIA**

KELEN SALAROLI VIANA, filha de Ralph Willian Barreto Viana e Ilizabete Salaroli Viana, nasceu em 13 de novembro de 1978, na cidade de Campos dos Goytacazes – RJ.

Concluiu o segundo grau no curso científico da Escola Estadual Liceu de Humanidades de Campos, em 1994. Em janeiro de 2003 concluiu o curso de nível superior em Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Norte Fluminense-Darcy Ribeiro.

Foi admitida em março de 2003 no Curso de Pós-Graduação em Produção Animal, Mestrado, Reprodução Animal, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em Campos dos Goytacazes – RJ, submetendo-se à defesa de tese para conclusão do curso em março de 2005.

## CONTEÚDO

LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS .....	x
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Maturação oocitária.....	3
2.1.1. Maturação nuclear.....	4
2.1.2. Maturação citoplasmática.....	4
2.1.3. Inter-relação <i>cumulus</i> – oócito .....	6
2.2. Fatores que afetam a maturação oocitária.....	8
2.2.1 Fator promotor da maturação (MPF) e proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK).....	8

2.2.2	Monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e proteínas cinases	10
2.2.3	Óxido nítrico (NO)	12
2.2.3.1	NO na maturação oocitária	14
3.	OBJETIVOS	18
4.	MATERIAL E MÉTODOS	19
5.	RESULTADOS	24
6.	DISCUSSÃO	30
7.	CONCLUSÕES	36
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Efeito da adição de diferentes concentrações de SNP na maturação nuclear e expansão do <i>cumulus</i> dos oócitos.....	25
Tabela 02: Efeito da adição de $10^{-3}$ M de SNP na progressão de MI para MII em oócitos bovinos maturados por 48 horas com troca de meio sem SNP as 24 h ou não.....	27
Tabela 03: Efeito da adição de $10^{-3}$ M de SNP na cinética do rompimento da vesícula germinativa durante a maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos.....	28
Tabela 04: Efeito da adição de diferentes concentrações de SNP durante a maturação de oócitos bovinos <i>in vitro</i> na taxa de oócitos que apresentaram migração total dos grânulos corticais, clivagem e produção de blastocistos após a fertilização.....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS

AC – Adenilato ciclase  
AMPc – adenosina monofosfato cíclica  
BSA – Soroalbumina Bovina  
CDKs – ciclinas dependentes de cinases  
COC – Complexo *cumulus* oócito  
CO<sub>2</sub> – Gás carbônico  
E<sub>2</sub> – Estradiol  
ERK – cinase regulada extracelular  
FIV – Fertilização *in vitro*  
FSH – Hormônio folículo estimulante  
GC – grânulo cortical  
GMPc – guanosina 3' 5' - monofosfato cíclica  
hCG – Gonadotrofina Corionica Humana  
iAC – Adenilato ciclase invasiva  
I $\alpha$ I – inibidor da inter- $\alpha$ -tripsina  
IBMX – 3 isobutil metil xantina  
LH – Hormônio luteinizante  
L - NAME – N<sup>w</sup>-nitro-L-arginina metil éster  
MAPK – MAP cinase

MIV – Maturação *in vitro*  
MI – Metáfase I  
MII – Metáfase II  
MPF – Fator promotor da maturação  
NaCl – Cloreto de sódio  
NO – Óxido nítrico  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – Nitrito  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – Nitrato  
NOS – óxido nítrico sintase  
cNOS - óxido nítrico sintase constitutível  
nNOS - óxido nítrico sintase neuronal  
eNOS – óxido nítrico sintase endotelial  
iNOS – óxido nítrico sintase induzível  
O<sub>2</sub> – Oxigênio  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> – Superóxido  
ONOO<sup>-</sup> – Peroxinitrito  
PDE – Fosfodiesterase AMPc  
PIV – Produção *in vitro*  
PKA – Proteína cinase A  
PKC – Proteína cinase C  
RVG – Rompimento da vesícula germinativa  
SFB – Soro fetal bovino  
SNAP – S-nitroso-*N*-acetilpenicilamina  
SNP – Nitroprussiato de sódio  
TCM – Meio de cultura de tecidos  
TNF $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  
TPZ – Projeção transzonal  
TSG-6 – fator de necrose tumoral estimulado pelo gene 6  
VG – Vesícula germinativa  
ZP – Zona Pelúcida

## RESUMO

VIANA, Kelen Salaroli, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense; março de 2005; Efeito da adição de óxido nítrico na maturação *in vitro* de oócitos bovinos; Professor(a) Orientador (a): Maria Clara Caldas Bussiere

O óxido nítrico (NO) é um radical livre altamente reativo, que está envolvido na sinalização intra e intercelular de várias etapas da reprodução. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da adição de nitroprussiato de sódio (SNP), um doador de NO, na maturação nuclear e citoplasmática *in vitro* de oócitos bovinos. Foi realizada análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste t a 5% de probabilidade. Concentrações baixas de SNP ( $10^{-7}$  e  $10^{-9}$  M) não tiveram efeito significativo na maturação nuclear, contudo, quando foi adicionada concentração alta de SNP ( $10^{-3}$  M) no meio, ocorreu retardo/inibição da maturação nuclear ( $P < 0,05$ ), onde os oócitos permaneceram em metáfase I (MI) após 24 h de cultivo e também ocorreu inibição da expansão do *cumulus*. Para se avaliar se este efeito era reversível e se havia ocorrido um retardo ou inibição da progressão de MI para MII, os oócitos foram maturados: por 24h sem SNP (controle), por 48h com SNP realizando troca por meio sem SNP às 24h de cultivo (grupo 1) e por 48h com SNP sem troca de meio (grupo 2). Foi observado que mesmo após 48h, os oócitos permaneceram em MI tanto no grupo 1 como no 2. Foi realizada a cinética da maturação nuclear para se avaliar se houve ou não retardo na progressão da meiose com a concentração de  $10^{-3}$  M de SNP. Observou-se que esta

concentração retardou o rompimento da vesícula germinativa às 8 h de cultivo ( $P < 0,05$ ) e às 12 h., não houve diferença significativa entre o controle e o tratamento. Os oócitos tratados com as concentrações que não apresentaram alteração na maturação nuclear, foram avaliados quanto à maturação citoplasmática. A concentração de  $10^{-5}$  M melhorou a percentagem de migração total dos grânulos corticais ( $P < 0,05$ ), e também aumentou a percentagem de produção de blastocistos. Na concentração de  $10^{-9}$  M foi observado diferença apenas na produção de blastocisto. Baseados nos resultados apresentados por este estudo, podemos sugerir que o NO em alta concentração ( $10^{-3}$  M de SNP) tem uma ação citotóxica, mas em concentração intermediária ( $10^{-5}$  M de SNP) e baixa ( $10^{-9}$  M de SNP) aumenta a taxa de blastocistos por vias diferenciadas, mostrando que o NO também pode ter tanto um efeito inibitório quanto estimulatório na maturação de oócitos bovinos *in vitro*, dependendo da sua concentração.

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



## ABSTRACT

VIANA, Kelen Salaroli, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense; 2005 march; Effect of the addition of nitric oxide on maturation in vitro of bovine oocyte; Professor Advisor: Maria Clara Caldas Bussiere

Nitric oxide (NO) is highly reactive free radical, that is involved in intra and intercellular signaling in some stages of reproduction. The objective of the present study was to evaluate the effect of the addition of sodium nitroprusside (SNP), NO donor, on nuclear and cytoplasmic in vitro maturation of bovine oocytes. Analysis of variance was carried out and the means were compared by t test at a level of 5%. Low concentrations of SNP ( $10^{-7}$  and  $10^{-9}$  M) had no significant effect on nuclear maturation, however, when a high concentration of SNP ( $10^{-3}$  M) was added/retarded nuclear maturation ( $P < 0.05$ ), where oocytes remaining in metafase I (MI) after 24 h culture. Inhibition of cumulus expansion also occurred. To evaluate if this effect was reversible and if a retardation or inhibition had occurred of the progression from MI to MII, oocyte were in MII in presence of  $10^{-3}$  M of SNP for 48 h with change of way (without SNP) or not. After 48h, the oocyte had remained in MI even when the medium was out changed at 24 h without SNP or not. The kinetics of the nuclear maturation was carried to evaluate if there had been or not a retardation in the progression of meiosis with the concentration of  $10^{-3}$  M SNP. This concentration delayed the germinal vesicle breakdown at 8 h of culture ( $P < 0.05$ ) and at 12 h, there was no significant difference between the control and the treated

group. The concentrations that did not induced alteration in the nuclear maturation were evaluated for cytoplasmic maturation. The concentration of  $10^{-5}$  M improved the percentage of total migration cortical granules ( $P < 5\%$ ), and had significant effect in the percentage of blastocysts, but the concentration of  $10^{-9}$  M improved the percentage of blastocysts only. These results indicate that the nitric oxide can have both stimulatory and inhibitory effect on the maturation of bovine oocyte in vitro, depending on its concentration.

Key-words: bovine, IVF, IVM, nitric oxide, oocyte.

## 1. INTRODUÇÃO

Tecnologias de produção de embriões são uma combinação de reprodução assistida, biologia molecular e celular, e técnicas genômicas (GALLI *et al.*, 2003). Dentre elas se destacam a inseminação artificial (IA), transferência de embriões, fertilização *in vitro* (FIV), clonagem e transgênese. Sua utilização clássica em animais de produção (carne, leite, lã), tem buscado aumentar o número de animais com genótipos superiores, mas com os avanços obtidos nestas biotécnicas, elas têm se tornado uma ferramenta importante para a pesquisa biomédica.

Embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV), diferem consideravelmente na qualidade, quando comparados com os embriões desenvolvidos *in vivo* (KNIJIN *et al.*, 2003). Um grande número de parâmetros morfológicos e bioquímicos tem sido estudado em relação à foliculogênese e à qualidade dos embriões durante a PIV. O desenvolvimento embrionário seguido da maturação – fertilização *in vitro* (MIV-FIV) é muito influenciado pelas condições dos meios utilizados, desde a maturação do oócito, até a produção de blastocistos (RIZOS *et al.*, 2002).

Assim, mais pesquisas investigando a maturação do oócito, fertilização e desenvolvimento do embrião, são necessárias para aprimorar as tecnologias aplicadas à reprodução assistida em animais e humanos, e também para revelar as causas de desenvolvimento anormal do embrião (THOMPSON *et al.*, 1995).

O óxido nítrico (NO) vem se destacando como uma molécula envolvida na sinalização intra e intercelular, apresentando um importante papel fisiológico em várias etapas da reprodução, tais como: desenvolvimento folicular, maturação do oócito, ovulação, capacitação espermática e desenvolvimento embrionário (VAN VOORHIS *et al.*, 1994; ZINI *et al.*, 1996; DIXIT e PARVIZI, 2001). Diferentes concentrações de NO no meio de cultivo podem inibir (JABLONKA-SHARIFF *et al.*, 1999 e MATTA *et al.*, 2002) ou estimular (SENGOKU *et al.*, 2001) a maturação nuclear de forma dose-dependente. FAES *et al.* (2002), demonstraram que folículos ovarianos atrésicos de bovinos apresentam concentração mais elevada de NO no fluido folicular do que os saudáveis. MATTA *et al.* (2002), observaram que o complexo *cumulus*-oócito (COC) de bovinos, sintetiza NO durante a maturação *in vitro*, e a inibição da síntese de NO durante este período diminui a produção *in vitro* de blastocistos. Estes dados sugerem que concentrações adequadas no meio são necessárias para que a maturação e fertilização *in vitro* de oócitos bovinos ocorra normalmente.

Numerosas pesquisas têm utilizado substâncias doadoras de NO *in vivo* e *in vitro*, para modificar as concentrações de NO, como o nitroprussiato de sódio (SNP) e o S-nitroso-L-acetil-penicilamina (SNAP), possibilitando o estudo do papel do NO na maturação de oócitos de roedores e suínos. A adição de SNP em baixa concentração no meio de maturação, estimulou a progressão da meiose em oócitos de ratas (SENGOKU *et al.*, 2001; BU *et al.*, 2003), enquanto que a adição de SNP em concentração elevada, promoveu significativa inibição (BU *et al.*, 2003). Tendo em vista que a inibição da produção de NO diminuiu a produção de blastocistos bovinos *in vitro* (MATTA *et al.*, 2002), objetivou-se no presente estudo, avaliar se a adição de diferentes concentrações do nitroprussiato de sódio (um doador de NO) no meio de maturação, promoveria um efeito benéfico nesta taxa. Além disso, poderia auxiliar na maior compreensão do mecanismo de ação desse sinalizador inter e intra-celular durante a maturação nuclear e citoplasmática do oócito bovino e identificação da concentração adequada de NO, no meio de maturação de oócitos bovinos *in vitro*. A determinação da concentração ideal no meio, permitirá que maiores taxas de desenvolvimento embrionária sejam alcançadas e assim, seria possível contribuir para o aumento da eficiência da produção *in vitro* de embriões.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Maturação oocitária

Os oócitos sofrem uma série de mudanças nucleares e citoplasmáticas, que os preparam para a fertilização durante a retomada da meiose. Tais alterações são referidas como maturação. Estes eventos incluem rompimento do envelope nuclear, condensação da cromatina e formação do fuso (mudanças nucleares), como mudanças no citoplasma, redistribuição, aumento no número e mudança na morfologia de organelas, formação de gotículas lipídicas, redução do número de complexos de golgi e alinhamento dos grânulos corticais (GAVIN *et al.*, 1994; FUJIWARA *et al.*, 1993; HYTTEL *et al.*, 1997). A progressão coordenada e a conclusão destas mudanças durante a maturação, asseguram a fertilização e o início do desenvolvimento embrionário.

Tanto a maturação nuclear quanto a maturação citoplasmática são consideradas importantes para o desenvolvimento normal do embrião após a fertilização (PLACHOT e CROZET, 1992; YANG *et al.*, 1998). Muitos fatores biológicos atuam juntos preparando o oócito imaturo para o desenvolvimento de embriões competentes (YANG *et al.*, 1998). Alguns defeitos na maturação do oócito podem ser causados por uma maturação nuclear e/ou citoplasmática inadequadas (PLACHOT e CROZET, 1992; YANG *et al.*, 1998).

### **2.1.1 Maturação nuclear**

Durante a fase de crescimento, oócitos de mamíferos são mantidos no estágio de diplóteno da prófase da primeira divisão meiótica. A meiose não é retomada até a puberdade, quando começam a ocorrer estímulos para que sua progressão ocorra. O início da maturação meiótica é marcado por uma ondulação da membrana nuclear (vesícula germinativa), os poros nucleares desaparecem e então a membrana sofre fragmentação e rapidamente desaparece. Este fenômeno é conhecido como rompimento ou quebra da vesícula germinativa (RVG) (LÉNÁRT e ELLENBERG, 2003). Concomitantemente ocorre a condensação dos cromossomos, formação do fuso, separação dos cromossomos homólogos com extrusão do primeiro corpúsculo polar e progressão para metáfase da segunda divisão meiótica (M II) (KUBELLA *et al.*, 1988). Um período de 24 horas é necessário para o oócito bovino completar a maturação nuclear (SIRARD *et al.*, 1989).

A habilidade do oócito em completar a meiose é conhecida como competência meiótica e é adquirida gradualmente durante o crescimento folicular. Os oócitos primeiramente adquirem capacidade para sofrer o RVG e a condensação dos cromossomos, enquanto que a habilidade de progressão para metáfase da primeira divisão meiótica (MI) é adquirida posteriormente (TSAFRIRI e CHANNING, 1975) e finalmente eles adquirem habilidade para alcançar a MII (SORENSEN e WASSARMAN, 1976). A total competência meiótica parece ser adquirida em folículos com 3 mm, que possuem oócitos com 110µm de diâmetro (FAIR *et al.*, 1995), que é o tamanho máximo do oócito, estando assim capazes de completar a transição de MI para MII (MOTLIK *et al.*, 1984)

### **2.1.2 Maturação citoplasmática**

Durante o desenvolvimento pré-ovulatório do folículo, os microtúbulos na interfase dão suporte a processos associados com o posicionamento de organelas e segue até a fase de crescimento da oogênese. A preparação para a retomada da meiose se inicia quando os centrossomos dos oócitos de folículos antrais tornam-se

fosforilados e os microtúbulos da interfase são despolarizados. O período pré-ovulatório, durante o qual a retomada da meiose é normalmente iniciada pelas gonadotrofinas, envolve agregação de centríolos e fuso morfogenético. Ambos os eventos são conhecidos por estarem associados à agregação dependente de microtúbulos e dispersão de organelas (ALBERTINI, 1987). Durante este período, distúrbios temporais na organização dos microtúbulos podem levar a vários defeitos notáveis no desenvolvimento, muitos dos quais seriam bem substantiados para estudos em mamíferos (HASSOLD, 1986).

Mudanças no compartimento citoplasmático são caracterizadas pelo contínuo desenvolvimento de gotas lipídicas no oócito, redução no compartimento de golgi, alinhamento dos grânulos corticais que formam um bloqueio estrutural à poliespermia e surgimento de numerosos ribossomos adjacentes aos cromossomos (KRUIP *et al.*, 1983; ASSEY *et al.*, 1994). Com essas modificações, o oócito é considerado maduro e está apto para desenvolver-se a embrião após a fertilização. O aumento gradual das gotas lipídicas é de grande importância para a fase de desenvolvimento embrionário inicial.

Em oócitos de mamíferos, a poliespermia induz a um desequilíbrio genético e resulta na morte embrionária inicial. Grânulos corticais são organelas derivadas do complexo 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. Após a fusão dos gametas, os GC se fundem com o oolema e liberam seu conteúdo no espaço perivitelínico, em um evento conhecido como reação cortical (BRADEN *et al.*, 1954). Supõe-se que o conteúdo liberado pelos GC no espaço perivitelínico 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 micro-ambiente satisfatório no espaço perivitelínico e “endurecendo” a zona pelúcida (SCHMELL e GULYAS, 1980), aumentando assim a habilidade de proteção do embrião.

### 2.1.3 Inter-relação *cumulus* – oócito

Em vários tipos celulares se visualiza, pela microscopia eletrônica, a presença de uma região eletrondensa onde as membranas de duas células adjacentes são separadas por uma fenda estreita e uniforme. Esta fenda, entretanto, é entremeada por moléculas protéicas formadoras de canal, que permitem a passagem direta de íons inorgânicos e outras pequenas moléculas hidrossolúveis do citoplasma de uma célula para outra. A essa comunicação célula-célula, dá-se o nome de junções comunicantes (ALBERTS *et al.*, 1997).

No ovário de mamíferos, o contato entre oócito e células do *cumulus* é evidente em folículos primordiais, por meio de junções comunicantes (GRAZUL-BILSKA *et al.*, 1997). Quando a foliculogênese é iniciada, a deposição gradual da zona pelúcida na superfície do oócito cria uma barreira de matriz extracelular permanente, mas maleável, entre as células germinativas e somáticas. Para estabelecer e manter o contato físico direto das interfaces heterocelulares, projeções das células da granulosa são criadas em fendas na zona pelúcida e são ancoradas na superfície do oócito. A este artifício usado pelas células do *cumulus* para estabelecer um conduto físico para comunicação entre células, dá-se o nome de projeção transzonal (TPZ) (ALBERTINI, 2002).

MOTTA *et al.* (1994), revelaram que existem variações na densidade e organização das TPZs, durante o desenvolvimento de folículos ovarianos humanos. Variações na extensão da penetração das TPZs no oolema, que diminuem com o avanço da foliculogênese, seguem um modelo similar. Existem evidências consideráveis sugerindo que a modulação das junções comunicantes esteja sujeita a um controle temporal e espacial (GRAZUL-BLISKA *et al.*, 1997), e que estas são necessárias para o sucesso da foliculogênese e oogênese (CARABATSOS *et al.*, 2000).

Estas comunicações facilitam as transferências de substâncias entre as células como nucleotídeos, açúcares, ácidos graxos, aminoácidos, etc., os quais são requeridos em várias etapas do crescimento do oócito (GOSDEN e BOWNES, 1995). As junções comunicantes podem também promover o transporte de substâncias que participam de mecanismos pelo qual um tipo de célula pode regular a função de outra. Moléculas que passam via junções comunicantes, são necessárias para o crescimento



e desenvolvimento do oócito. Por exemplo, o AMPc é uma molécula que é transmitida pelas células da granulosa via junções comunicantes e afeta a atividade do oócito (EPPIG, 1994; GOSDEN e BOWNES, 1995).

Uma outra forma de comunicação entre oócito e células do *cumulus* é via sinalização parácrina. Tem se observado que o oócito possui um importante papel como regulador da foliculogênese e que existe uma comunicação bidirecional entre oócito e células somáticas. Tem se focalizado, dentre os fatores parácrinos produzidos pelo oócito, os membros da família TGF- $\beta$ , dando destaque ao GDF-9 (do inglês growth differentiation factor-9). GDF-9 ativo, pode induzir a secreção do hialuronan pelas células do *cumulus*, junto com outras proteínas derivadas do folículo, formando a matriz muco elástica, responsável pela expansão do *cumulus*. (HURK e ZHAO, 2005).

Na maioria dos mamíferos, as células da granulosa murais, promovem seletiva degradação da matriz peri-folicular, resultando na formação de uma área mais delgada no ápice do folículo, onde ocorrerá a liberação do complexo *cumulus*-oócito (ovulação). Ao mesmo tempo, as células do *cumulus* sintetizam e depositam uma matriz extracelular visco-elástica ao redor do oócito, um processo conhecido como expansão do *cumulus* ou mucificação. Esta matriz funciona como um veículo essencial para a protusão do oócito no momento da ovulação. CHEN *et al.* (1993), demonstraram que componentes específicos da matriz são também requeridos para o transporte do oócito pelo epitélio ciliado das fímbrias para a ampola.

A matriz é composta pelo glicosaminoglicano hialuronan, que forma a estrutura principal (EPPIG, 1979), fator de necrose tumoral estimulado pelo gene 6 (TSG-6), (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2001) e pelo inibidor da inter- $\alpha$ -tripsina ( $I\alpha I$ ), (CHEN *et al.*, 1992). O hialuronan possui a habilidade de atrair solventes, que é responsável pelo aumento do espaço intercelular entre as células do *cumulus*, levando a expansão destas. O TSG-6 é uma proteína da matriz que forma um complexo estável com o  $I\alpha I$  durante a expansão do COC (CARRETTE *et al.*, 2001). Está bem estabelecido que o  $I\alpha I$  torna-se covalentemente ligado ao hialuronan na matriz, e isto contribui para a sua estabilidade (CHEN *et al.*, 1996). Estudos em roedores demonstraram que a expressão do TSG-6 é estimulada por gonadotrofinas nas células do *cumulus* e sua interação com componentes da matriz ( $I\alpha I$  e hialuronan), são essenciais para promover a formação da matriz do COC (RUSSEL *et al.*, 2003; OCHSNER *et al.*, 2003a).

OCHSNER et al. (2003b), demonstraram que a formação deste complexo, e conseqüente expansão do COC, pode ser controlada por mais de uma via de sinalização. Dentre estas vias estaria a cascata de reação da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) e proteína cinase A (PKA), que são essenciais para este processo.

## **2.2 Fatores que influenciam a maturação**

### **2.2.1 Fator promotor da maturação (MPF) e outras proteínas cinases**

A maturação oocitária em todas as espécies parece requerer a produção do fator promotor da meiose ou da fase M (MPF) no oócito. O MPF é uma proteína serina-treonina cinase, composto por uma subunidade catalítica ( $p34^{cdc2}$ ) e uma regulatória, ciclina B (LABBE *et al.*, 1989; PINES e HUNTER, 1989; GAUTIER *et al.*, 1990). Durante o ciclo celular a atividade do MPF é regulada pela fosforilação-desfosforilação da subunidade  $p34^{cdc2}$  e sua associação com a ciclina B (CLARKE e KARSENTE, 1991). Especificamente, a ativação do MPF envolve a associação da ciclina B e  $p34^{cdc2}$  e seletiva desfosforilação da  $p34^{cdc2}$  em dois resíduos, tirosina 15 (Tyr15) e treonina 14 (Thr14) (GAUTIER *et al.*, 1988, 1990; DUNPHY e NEWPORT, 1989). Em oócitos, esta ativação ocorre inicialmente na transição de G2 para fase M. Porém, antes da indução da fase M, a  $p34^{cdc2}$  e a ciclina B estão presentes na forma de pré-MPF, um estado inativo desta proteína (PARKER *et al.*, 1991).

O MPF pode atuar antes ou concomitantemente com o RVG. Sua atividade aumenta até a metáfase I (MI) e diminui durante a transição de anáfase para telófase. A atividade aumenta novamente até o oócito alcançar a MII, e é mantida em altas concentrações até a fertilização. A inativação do MPF resulta na saída da metáfase, e durante a maturação oocitária ela ocorre na transição da MI para anáfase I e novamente na fertilização. A fosforilação da  $p34^{cdc2}$  (DORÉE *et al.*, 1989) e a degradação da ciclina (MURRAY *et al.*, 1989), são requeridas para que ocorra inativação do MPF. Entretanto, apesar de ambos os eventos serem requeridos para o término da fase M, a destruição proteolítica da ciclina B parece ser o principal evento associado à inativação da atividade do MPF (GLOTZER *et al.*, 1991).

O MPF está envolvido na condensação da cromatina, no RVG (HEALD e MCKEON, 1990; PETER *et al.*, 1990; WARD e KIRSCHNER, 1990) e na formação do fuso meiótico (MURRAY *et al.*, 1989). O MPF ativo catalisa o RVG pela indução da dissociação das moléculas da lâmina nuclear (ALBERTS *et al.*, 1994), e também fosforila a histona H1 e proteínas associadas aos microtúbulos (ALBERTS *et al.*, 1994).

MPF e outras ciclinas dependentes de cinases (CDKs), são moléculas chave na regulação da progressão do ciclo celular durante a mitose e meiose. Entretanto, recentes pesquisas têm revelado que a cascata da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) é outro importante sistema regulatório e que interage com o MPF durante a progressão do ciclo celular meiótico em oócitos. A MAPK, a qual pode ser também chamada cinase regulada extracelular (ERK), é uma serina-treonina cinase que é ativada via uma cascata de proteína cinase no início da maturação oocitária em *Xenopus* (HACCARD *et al.*, 1990), camundongos (VERLHAC *et al.*, 1993) e suínos (INOUE *et al.*, 1995). A atividade da MAPK, está associada com a indução da meiose em oócitos de *Xenopus* (HACCARD *et al.*, 1995) e embora esteja ativada no início da maturação em camundongos, ela não parece ser necessária para que ocorra o RVG nesta espécie (SUN *et al.*, 1999). A MAPK está associada a vários eventos citoplasmáticos, incluindo a regulação da dinâmica dos microtúbulos, formação do fuso e condensação dos cromossomos (VERLHAC *et al.*, 1993, 1994; DEDIEU *et al.*, 1996). A dinâmica dos microtúbulos é responsável pelo deslocamento da cromatina para a periferia e rearranjo das organelas no citoplasma do oócito (VERLHAC *et al.*, 1994) e sua importância na maturação oocitária já foi demonstrada por vários pesquisadores (VERLHAC *et al.*, 1994; ROZINEK *et al.*, 1995; KIM *et al.*, 1996, 2000).

Na maioria dos oócitos, alta atividade de MAPK é mantida durante a progressão para MII, diminuindo após a fertilização (FERRELL *et al.*, 1991; DEDIEU *et al.*, 1996). Porém, diferentemente do que ocorre com o MPF, a cinética de ativação da MAPK durante a maturação oocitária varia em diferentes espécies e em diferentes modelos de maturação. Em algumas espécies, como camundongos e ratos, a ativação da MAPK não é requerida para a ativação inicial do MPF e ocorre duas horas após o RVG espontâneo (VERLHAC *et al.*, 1993; TAN *et al.*, 2001). Em oócitos de espécies domésticas de grande porte, a associação temporal entre ativação da MAPK e RVG é menos definida. FISSORE *et al.* (1996), demonstraram que em oócitos bovinos, a

ativação da MAPK e MPF ocorreu simultaneamente às 6 h de cultivo em meio de maturação, sendo então anterior ao RGV que ocorre 8 h após o cultivo (DEDIEU *et al.*, 1996).

Embora a atividade da MAPK não seja necessária para o RVG espontâneo em oócitos de mamíferos, existem evidências de que o aumento artificial na sua atividade acelera o RVG. Em oócitos bovinos, a injeção de RNAm para MOS, um proto-oncogene que ativa a MAPK, levou a uma rápida ativação da MAPK que resultou em uma retomada da meiose acelerada (FISSORE *et al.*, 1996). A inibição da atividade da MAPK preveniu a retomada da meiose estimulada pelo LH em oócitos nos folículos de camundongos, assim como também preveniu a elevação na expressão de dois genes cujos produtos são necessários para a expansão normal do *cumulus* (SU *et al.*, 2003). Estudos sugerem que embora em condições naturais a MAPK não esteja envolvida na ativação inicial do MPF durante a retomada da meiose, a ativação artificial da MAPK em oócitos pré-maturados de mamíferos pode levar a ativação do MPF e RGV por um mecanismo indefinido (JOSEFSBERG *et al.*, 2003; INOUE *et al.*, 1998). Contudo, a MAPK não está apta a substituir o MPF e apenas sua atividade não é suficiente para manter a progressão da maturação meiótica.

### **2.2.2 Monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e proteínas cinases**

Muitos estudos têm demonstrado que o fluido folicular suprime a maturação dos oócitos. Dentre os compostos envolvidos, estão peptídios de baixo peso molecular (TSAFRIRI 1988) e purinas como hipoxantina e adenosina (DOWNS *et al.*, 1985; EPPIG *et al.*, 1985). Estes compostos inibitórios provavelmente são produzidos localmente e são modificados, ou interagem com o monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), para manter o bloqueio meiótico. Esta idéia é sustentada pelo fato de que o fluido folicular está intimamente relacionado com agentes que mantêm o AMPc elevado para bloquear o rompimento espontâneo da vesícula germinativa (CHARI *et al.*, 1983; DOWNS e EPPIG 1984). Resultados de vários estudos têm demonstrado que o bloqueio meiótico no oócito dentro do folículo é mantido pelo constante fornecimento de AMPc, o qual é transportado para o oócito pelas células do *cumulus* através das junções comunicantes (TSAFRIRI e ADASHI 1994; DOWNS, 1995; EPPIG, 1991).

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, sugerindo que o AMPc funciona como um regulador da maturação nuclear em oócitos de mamíferos (BILLIG *et al.*, 1988; EPPIG, 1989). A diminuição da concentração do AMPc também é atribuída a um aumento na atividade da enzima fosfodiesterase (PDE), ou a uma diminuição na atividade da adenilato ciclase (AC), no oócito (EPPIG, 1989). A maioria das PDE expressas em oócitos de ratos, camundongos (WIERSMA *et al.*, 1998) e bovinos (SIRARD *et al.*, 2003) é a do tipo PDE3 e inibidores específicos dessa classe de PDE previnem a maturação *in vivo* e *in vitro*.

Estudos sugerem que o aumento do AMPc no oócito também pode ocorrer como resultado do transporte de precursores do AMPc ou estimuladores da AC para o oócito (WASSARMAN e ALBERTINI 1994). Em bovinos, a AC tem sido localizada nas células do *cumulus*, especificamente nas que estão em contato direto com o oócito (KUYT *et al.*, 1988). Outros estudos demonstraram a atividade da AC na membrana de oócitos bovinos (BILODEAU *et al.*, 1993).

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 cinase dependente de AMPc (PKA). Esta cinase 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 a subunidade regulatória da PKA. Porém, para controlar o nível intracelular de AMPc, a 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 a via pela PKA, a proteína cinase C parece estar envolvida na regulação da maturação meiótica (DOWNS *et al.*, 2001). A proteína cinase C (PK-C) é uma serina treonina que participa de vários eventos do ciclo de transição celular da maturação de oócitos (VIGNOLA, 1995). A PK-C, estimula a maturação nuclear de oócitos em bovinos (VIGNOLA, 1995) e suínos (SU *et al.*, 1999). É sugerido que, de forma semelhante a PKA, existe um sistema de compartimentalização entre 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.

### 2.2.3 Óxido nítrico (NO)

O NO é um radical livre altamente reativo com uma meia-vida curta. Ele é rapidamente oxidado para nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), 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 cofatores como  $\text{Ca}_2^+$ /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  $\text{Ca}_2^+$ /calmodulina dependente e a iNOS é  $\text{Ca}_2^+$ /calmodulina independente.

A cNOS libera NO em pequenas quantidades por períodos curtos em resposta ao estímulo no receptor (PALMER *et al.*, 1988) e pode ser subdividida em cerebral ou neuronal (nNOS) e a endotelial (eNOS). Elas são codificadas por diferentes genes localizados em diferentes cromossomos (BREDET *et al.*, 1991; SYNDER 1995). O NO gerado pela nNOS e eNOS, participa de várias respostas fisiológicas incluindo neurotransmissão, manutenção do tônus vascular, inibição da agregação plaquetária, prevenção da adesão plaquetária pelas células endoteliais, regulação da apoptose e inibição da migração e proliferação de células da musculatura lisa (DAWSON e DAWSON 1996; ROSSELLI *et al.*, 1998).

A iNOS é induzida após a ativação de vários tipos de células pelas citocinas e é responsável pela produção de NO em alta concentração por um período prolongado (SYNDER, 1995). O NO liberado por esta enzima está envolvido na vasodilatação patológica e danificação de tecidos (KILBOURN *et al.*, 1990).

Existem muitas funções que o NO pode exercer por meio da sua reação com proteínas, contendo em sua estrutura metal ou tiol, a qual pode resultar em ativação e/ou inibição da proteína alvo (STAMLER, 1994). Nos vasos sanguíneos, a ativação da guanilato ciclase solúvel pelo NO é um mecanismo pelo qual o NO derivado do tecido

endotelial afeta o relaxamento da musculatura lisa (STAMLER, 1994). Entretanto, tem sido mostrado que o NO inibe várias enzimas esteroidogênicas P450 (HANKE *et al.*, 1998), assim como ativa enzimas contendo o grupamento heme como as cicloxigenases (SALVEMINI *et al.*, 1993) e as lipoxigenases (McCANN *et al.*, 1997), com subsequente liberação de prostaglandinas e leucotrienos, respectivamente.

Diversos efeitos na citotoxicidade celular podem ser causados pelo NO, mas seu efeito é mais complexo em relação a apoptose. A morte celular mediada pela apoptose é controlada por sinais celulares específicos. O óxido nítrico pode tanto proteger quanto mediar esse tipo de morte celular, dependendo do tipo da célula e de sua concentração. A proteção pode ocorrer em diferentes condições. Por exemplo, o NO protege os hepatócitos *in vivo* da apoptose induzida pelo TNF $\alpha$  (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 cinase A e C, sugerindo que a transdução de sinais por meio destas proteínas está envolvida no mecanismo de ação do NO, que leva a apoptose (MESSMER *et al.*, 1995). Contudo, este mecanismo nunca foi estudado no sistema reprodutor de bovinos.

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).

O NO pode atuar por meio da sua ligação com radicais livres levando a inativação do O<sub>2</sub><sup>-</sup>, prevenindo assim a toxicidade celular. (COOK e TSAO, 1993). Entretanto, em condições apropriadas, a reação do NO com O<sub>2</sub><sup>-</sup> pode resultar na formação do peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), um potente oxidante (BECKMAN e CROW, 1993). Esses achados mostram que a ação do NO na célula depende da sua concentração,

seu estado reduzido, e da abundancia de metais, proteínas e tiols de baixo peso molecular, como a glutathiona.

### **2.2.3.1 NO na maturação oocitária**

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).

Todas as isoformas da NOS foram identificadas no sistema reprodutivo de fêmeas durante o desenvolvimento folicular (JABLONKA-SHARIFF e OLSON, 2000), na ovulação (JABLONKA-SHARIFF *et al.*, 1999; OLSON *et al.*, 1999), esteroidogênese (JABLONKA-SHARIFF e OLSON 1998), função do corpo lúteo (MOTTA *et al.*, 2001), e maturação meiótica (JABLONKA-SHARIFF e OLSON 2000; MATTA *et al.*, 2002; KAZUO *et al.*, 2001). O NO sintetizado pelas células ovarianas humanas e de ratas tem sido implicado como uma molécula sinalizadora importante durante o período peri-ovulatório (BEM-SHLOMO *et al.*, 1994; YAMAUCHI *et al.*, 1997). A atividade da NOS ovariana é aumentada pela gonadotrofina coriônica humana (hCG) (NAKAMURA *et al.*, 1996), e a inibição da NOS com agentes farmacológicos diminui o número de oócitos ovulados em ovários mantidos *in vitro* (BONELLO *et al.*, 1996; YAMAUCHI *et al.*, 1997) e *in vivo* (OLSON *et al.*, 1996). Ovários de roedores expressam tanto a eNOS como a iNOS, sendo ambas isoformas reguladas pelas gonadotrofinas (VAN VOORHIS *et al.*, 1995; JABLONKA-SHARIFF e OLSON 1997).

A eNOS foi localizada nas células da granulosa, células da teca, estroma ovariano (ZACKRISSON *et al.*, 1996), e em oócito de folículos em desenvolvimento (JABLONKA-SHARIFF e OLSON 1997). Diferentemente, a iNOS foi observada apenas nas células somáticas dos folículos (JABLONKA-SHARIFF e OLSON 1997; TAO *et al.*, 1997). Em bovinos, estudos demonstraram que as células da granulosa de folículos iniciais produzem mais NO do que as de folículos em estágio avançado (BASINI *et al.*, 1998), mostrando assim, que a atividade da NOS muda durante o desenvolvimento folicular, sugerindo que esta enzima esteja envolvida nas mudanças estruturais e



funcionais que ocorrem durante a foliculogênese. 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). Várias pesquisas indicam que o NO inibe (NAKAMURA *et al.*, 2002; MATTA *et al.*, 2002) e/ou estimula, (SENGOKU *et al.*, 2001; BLASHKIV *et al.*, 2001) a maturação meiótica, dependendo de sua concentração.

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). NO se liga e ativa a guanilato ciclase solúvel, e aumenta a concentração de GMPc nas células alvo (SCHIMIDT *et al.*, 1993). 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 efetuada pela 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.

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 contém muitas fontes de radicais livres, tais como macrófagos, neutrófilos e células da granulosa (OYAWOYE *et al.*, 2003). O fluido folicular contém alta concentração de antioxidantes, os quais protegem

o oócito de danos produzidos pelos radicais livres. 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.

Tem sido utilizada a adição de um doador de NO no meio de maturação para avaliar o comportamento do oócito frente a diferentes concentrações de NO. SENGOKU *et al.* (2001) demonstraram que na presença de baixa concentração de SNP ( $10^{-7}$  M), mas não de altas ( $10^{-5}$  e  $10^{-3}$  M), ocorre um aumento da percentagem de maturação em oócitos de ratas. NAKAMURA *et al.* (2002), observaram que a adição de SNAP em uma concentração de 500 $\mu$ M preveniu o rompimento da vesícula germinativa induzido pela administração do hCG, sugerindo que o NO pode estar envolvido na manutenção do bloqueio da meiose. Elevada concentração de SNP pode também suprimir a maturação espontânea em oócitos de comundongos (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 [ $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}$ ], sensível à luz e quando exposto, pode sofrer mudança eletrônica na sua estrutura. 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 de produto final. Se as condições são a favor da re-oxidação, então os intermediários reformarão o SNP (KRAGER, 2003).

MATTA *et al.* (2002), demonstraram em bovinos, que a adição do inibidor da síntese de NO (L-NAME,  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-3}$  mM) não inibe a meiose. Neste mesmo estudo foi observado que a maturação citoplasmática é mais sensível do que a nuclear a concentrações reduzidas de NO no meio de maturação, e que o NO está 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  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  diminuíram.

Quando em baixa concentração, o NO transmite sinais extracelulares para alvos intracelulares e regula a progressão da meiose. Quando em alta concentração, o NO pode reagir com o superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e produzir um outro radical ainda mais tóxico, o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (ESPEY *et al.*, 2000). Esta reação pode então 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 uso de um doador de NO estaria então, facilitando o estudo de tais fisiopatologias.

A inibição da síntese de NO impede a maturação *in vitro* adequada de oócitos. Contudo, não existem dados suficientes na literatura mostrando se a adição de NO no meio irá melhorar as condições de maturação de oócitos bovinos *in vitro*, e conseqüentemente aumentando a taxa de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. Portanto, são necessários mais estudos para se definir a concentração adequada de NO no meio para que ocorra uma completa maturação oocitária.

### 3. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo, foi avaliar o papel do NO na maturação do oócitos bovinos, pela adição de um doador dessa molécula (SNP), no meio de maturação.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliação:

- do efeito dose-resposta do SNP na maturação nuclear e na expansão das células do *cumulus*;
- se o efeito da adição de alta concentração de SNP bloqueia ou retarda a progressão da MI para MII e se este efeito é reversível ou não;
- da cinética da maturação nuclear após a adição de SNP na concentração que inibir a MIV nuclear.
- do efeito dose-resposta da adição de SNP na maturação citoplasmática, por meio da avaliação da migração dos grânulos corticais e da taxa de produção de embriões *in vitro*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta dos ovários e obtenção dos COCs

Ovários de vacas mestiças cíclicas em idades variadas foram obtidos semanalmente em abatedouros da região do município de Campos dos Goytacazes, RJ. Após a coleta, os ovários foram imediatamente colocados em frascos contendo solução salina e antibiótico, em temperatura ambiente. Os folículos foram aspirados usando seringa conectada a uma bomba de vácuo (90 mmHg) e os complexos *cumulus*-oócito (COC) foram imediatamente colocados em solução de TCM199 – HEPES acrescida de 5% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (100 UI/ml de penicilina e 100 UI/ml de estreptomicina), meio de lavagem, contendo 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX, 0,5 mM), para evitar a retomada espontânea da meiose após a remoção do folículo durante o período de manipulação do mesmo. O IBMX inibe a síntese da enzima que degrada o AMPc (fosfodiesterase-AMPc, AMPc-PDE), (EPPIG e DOWS, 1984). Após a seleção, os COCs foram lavados por 4 vezes em gotas de 1000 µl em meio de lavagem sem IBMX antes de serem colocados no meio de maturação. Os COCs, foram classificados em 4 categorias de acordo com o número de células e o aspecto compacto do *cumulus*, além da transparência e homogeneidade do ooplasma (De LOSS *et al.*, 1989). Somente os COCs com grau 1 e 2 foram utilizados (com pelo menos três ou 4 camadas de células do *cumulus*).

## **4.2 Maturação *in vitro***

Trinta oócitos provenientes do mesmo grupo de classificação foram transferidos para gotas de 150 µl de meio de maturação e mantidos por 24 h em estufa a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar. O meio de maturação (TCM 199), foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), FSH (0,5 µg/ml), LH (5 µg/ml), 17 β-estradiol (1 µg/ml), antibióticos (100 UI/ml de penicilina e 100 UI/ml de estreptomicina) e nitroprussiato de sódio em diferentes concentrações de acordo com cada tratamento. O SNP foi diluído no meio de maturação e usado imediatamente. Após 24 horas de maturação, os oócitos foram removidos e avaliados quanto a maturação nuclear e migração dos grânulos corticais.

## **4.3 Avaliação da morfologia nuclear**

Após o período de maturação, os oócitos foram desnudados pela remoção das células do *cumulus*, sendo colocados em tubos para microcentrifuga contendo 300 µl PBS acrescido de 10% SFB para agitação mecânica realizada com micro-pipetador. Em seguida, os oócitos foram fixados entre lâmina e lamínula por 24 a 48 h em etanol/ácido acético (3:1) (Merk), corados com orceína acética 2% (Sigma) e observados em microscópio de contraste de fase da marca NIKON (40x), para determinação dos estádios de maturação nuclear: vesícula germinativa (VG), metáfase I (MI), anáfase-telófase I (AI-TI), e metáfase II (MII).

## **4.4 Coloração de grânulos corticais**

Para a marcação dos grânulos corticais (GC) e cromatina, foi utilizado o método de YOSHIDA *et al.* (1993). Após o período de maturação, os oócitos foram desnudados mecanicamente conforme descrito para avaliação morfológica. Em seguida, foram colocados em solução de pronase (0,5%) em PBS a 39°C até que ocorresse a semi-dissolução da zona pelúcida, que foi totalmente removida mecanicamente em meio

TCM 199 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 minutos. Os oócitos foram então lavados três vezes em SB por 5 minutos cada vez, permeabilizados em Triton X-100 (0,1%) por 5 minutos e lavados novamente três vezes em SB. Em seguida, os oócitos foram incubados em solução de bloqueio contendo 0,0025% de lectina de *Lens culinaris* marcada com FITC (Sigma) a 37°C por 30 minutos no escuro e foram então lavados duas vezes em SB por 5 minutos. A montagem das lâminas foi feita utilizando um meio de montagem (glicerol-90% e TRIS suplementado com 0,5% de n-propil-10%), para a visualização dos grânulos corticais. De acordo com o padrão de distribuição dos grânulos corticais, os oócitos foram classificados em três grupos: GC distribuídos em grupos – oócito imaturo, GC dispersos (periféricos) e parcialmente em grupos – oócito parcialmente maturo e GC periféricos – oócito maturo, de acordo com HOSOE e SHIOYA (1996).

#### **4.5 Fecundação e cultivo *in vitro***

Foi utilizado sêmen congelado de um mesmo touro e de uma mesma partida. A seleção dos espermatozóides para a FIV foi feita segundo a técnica de gradiente de Percoll (Pharmacia), para a fecundação *in vitro*. Em um tubo cônico, foram adicionados 1ml de Percoll 90% e em seguida, 1ml de Percoll 45%. O gradiente foi mantido na estufa de CO<sub>2</sub> até o momento de sua utilização. 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 minutos a 598xg. Após a retirada do sobrenadante, uma nova centrifugação de 4 minutos a 149xg com aproximadamente 5 ml de TALP-SP foi realizada para remover o excedente do Percoll.

Após a maturação, grupos de 20 oócitos foram lavados (3x) em meio de fertilização e transferidos para gotas de 100 µl de meio de fertilização sob óleo mineral em placa de Petri (Corning 35x10mm). A concentração final de espermatozóides foi ajustada para 2x10<sup>6</sup>/ml e co-incubadas com o oócito a uma temperatura de 39°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 18h. O meio de fecundação *in vitro* utilizado foi o Talp-fecundação (Talp-fec), suplementado com 6 mg/ml de BSA livre de ácidos graxos,

2mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina, 250 mM de epinefrina e heparina a 1%. Após o período de fertilização (18h), os supostos zigotos foram lavados (3x) em meio de cultivo (TCM 199), suplementado com 10% de SFB e antibióticos (100 UI/ml de penicilina e 100 UI/ml de estreptomicina), para remoção parcial das células do *cumulus* e espermatozóides e, em seguida, transferidos para gotas de 100 µl de meio de cultivo (20 oócitos por gota) sob óleo mineral, onde foram mantidos por 9 dias a 39°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar. A cada 2 dias de cultivo foi realizada uma renovação de 40% do meio de cultivo.

## 4.6 Experimentos

### Experimento 1: Efeito da adição de diferentes concentrações do doador de NO (SNP) na maturação nuclear

O efeito de diferentes concentrações ( $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$  M) de SNP na maturação nuclear foi determinado pela avaliação da conformação nuclear. Também foi observada a expansão das células do *cumulus* podendo se observar expansão total ou parcial. A partir da observação de que os oócitos maturados com  $10^{-3}$  M de SNP permaneceram em MI após 24h de maturação e que não tinham expansão total do *cumulus*, cultivou-se os COCs em 3 grupos: por 24h sem SNP (controle), por 48h com SNP realizando troca por meio sem SNP às 24h de cultivo (grupo 1) e por 48h com SNP sem troca de meio (grupo 2), para se verificar se houve ou retardo ou bloqueio da progressão da meiose. Foi também avaliada a cinética (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h) de maturação nuclear com os oócitos tratados com esta concentração de SNP ( $10^{-3}$  M de SNP), para se verificar em que momento o tratamento começou a agir. Os oócitos foram retirados do meio de maturação, desnudados, fixados, corados e avaliados em microscópio óptico de contraste de fase para determinação do estágio de maturação nuclear (conforme descrito em material e métodos). Foram utilizados 30 COC em cada gota de cultivo (150 µl), e cada experimento foi repetido 6 vezes. O controle consistiu de COC sem tratamento.



## **Experimento 2: Efeito da adição de diferentes concentrações do doador de NO (SNP) na maturação citoplasmática**

Neste experimento, o efeito da adição das concentrações que não interferiram na maturação nuclear ( $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$  M de SNP), foi avaliado na maturação citoplasmática pela observação da distribuição dos grânulos corticais, taxa de clivagem e produção de blastocistos. Foram utilizados 20 – 30 COC em cada gota de cultivo, mantendo-se sempre a mesma proporção de oócito/meio de maturação (1/5  $\mu$ l) e cada experimento foi repetido 4-6 vezes. O controle consistiu de COC sem tratamento.

### **4.7 Análise Estatística**

Foi realizada uma análise de variância (ANOVA), para estudar o efeito da adição de diferentes concentrações do SNP na maturação nuclear e citoplasmática e as médias foram comparadas pelo teste t a 5% de probabilidade.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Experimento 1

*Influência de diferentes concentrações de SNP sobre a maturação nuclear e a expansão das células do cumulus*

Oócitos do grupo controle e os tratados com  $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-5}$  M de SNP (Tabela 01), alcançaram a metáfase II (MII, 100%) e somente os oócitos tratados com  $10^{-3}$  M de SNP apresentaram-se em metáfase I (MI,  $97,5 \pm 3,1\%$ ). Neste último grupo, foi observada apenas a expansão parcial do *cumulus* (Fig. 1).

A adição de concentração elevada de SNP ( $10^{-3}$  M), inibiu ou retardou a transição da MI para MII da meiose. As células do *cumulus* dos COCs tratados com essa concentração se soltavam facilmente durante a manipulação após 24 h de cultivo. O mesmo não foi observado no controle e nos oócitos tratados com as demais concentrações.

Tabela 01: Efeito da adição de diferentes concentrações de SNP na maturação nuclear e expansão do *cumulus* dos oócitos.

Tratamentos	n	M I (%)	M II (%)	Expansão Total do <i>cumulus</i> (%)
Controle	128	0,0 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
10 <sup>-9</sup> M	100	0,0 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
10 <sup>-7</sup> M	161	0,0 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
10 <sup>-5</sup> M	165	0,0 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
10 <sup>-3</sup> M	160	97,5±3,1 <sup>a</sup>	2,5±3,1 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>

Médias com letras iguais, não diferem pelo teste *t* (P>0,05)

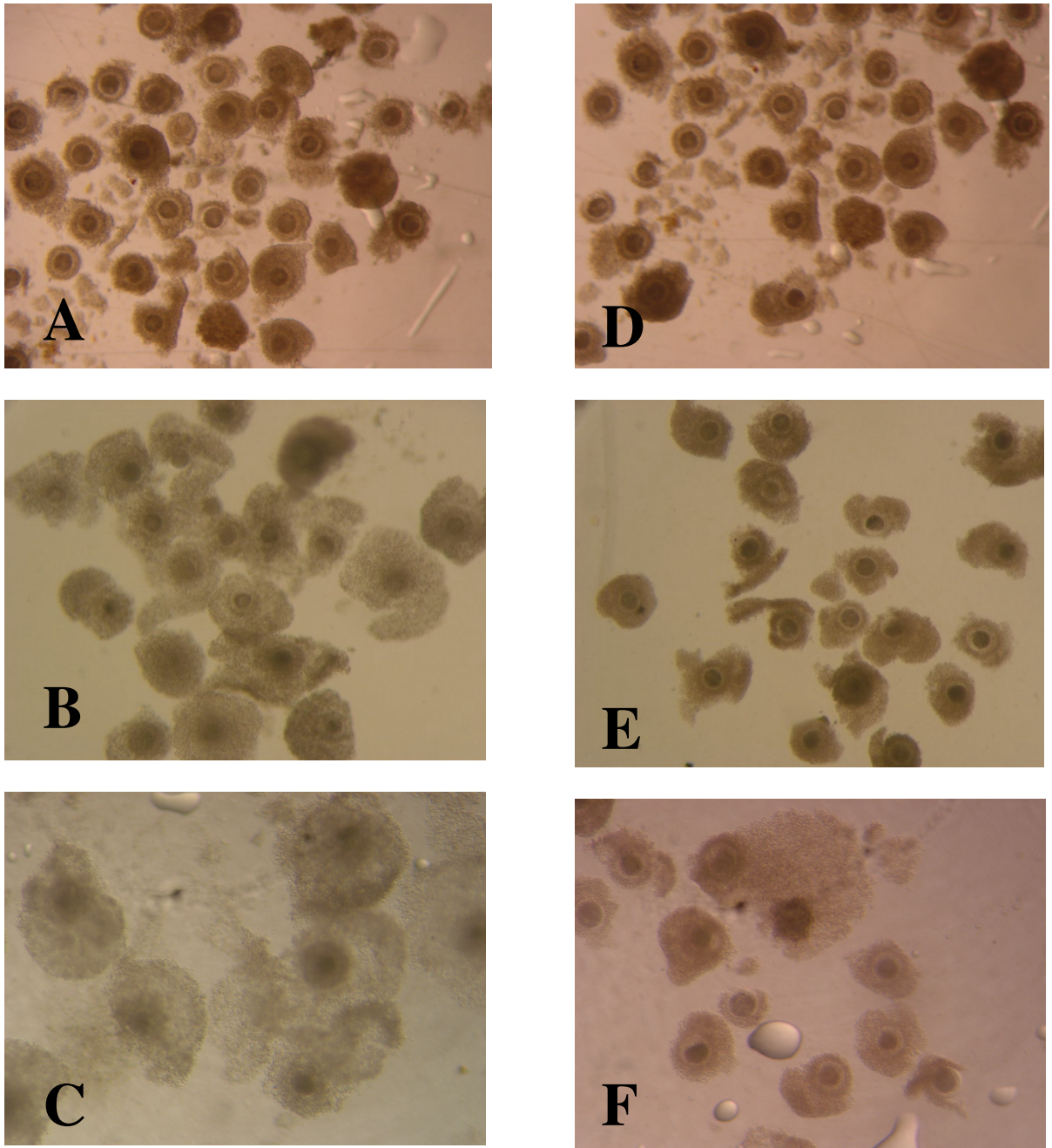


Fig. 1: Cinética da expansão do *cumulus*. As figuras A, B e C mostram oócitos do grupo controle após 0, 12 e 24h de maturação, e as figuras D, E e F mostram oócitos tratados com  $10^{-3}$ M de SNP no meio de maturação com 0, 12 e 24h de maturação, respectivamente. Pode-se observar que apenas os oócitos do grupo controle conseguiram ter expansão total do *cumulus*.

### *Reversibilidade do efeito inibitório do SNP*

Mesmo após 48h de cultivo, os COCs tratados com  $10^{-3}$ M de SNP não alcançaram a MII. Esse resultado foi observado tanto no grupo onde se realizou a troca por meio de maturação sem SNP quanto no grupo onde não houve troca (Tabela 02), mostrando que o efeito inibitório do SNP é irreversível.

Tabela 02: Efeito da adição de  $10^{-3}$  M de SNP na progressão de MI para MII em oócitos bovinos maturados por 48 horas com troca de meio sem SNP às 24 h ou não.

Tratamento	n	Estádio de maturação nuclear	
		MI (%)	MIII (%)
Controle (24h)	72	0,0 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
$10^{-3}$ c/ troca (48h)	114	100 <sup>b</sup>	0,0 <sup>b</sup>
$10^{-3}$ s/ troca (48h)	110	100 <sup>b</sup>	0,0 <sup>b</sup>

Médias com letras iguais, não diferem pelo teste *t* ( $P>0,05$ )

### *SNP retarda o rompimento da vesícula germinativa com 8 horas de cultivo*

Foi observado que nos oócitos tratados com  $10^{-3}$  M de SNP, o rompimento da vesícula não ocorreu simultaneamente ao controle às 8 horas de cultivo, sendo visualizado um retardo no grupo tratado neste horário (Tabela 03). Nos horários de 0, 2, 4, 6, 10 e 12, o grupo tratado apresentou comportamento similar ao controle.

Tabela 03: Efeito da adição de  $10^{-3}$  M de SNP na cinética da manutenção da vesícula germinativa durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

Tempo(h)	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h
Controle (%)	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	42,5±17,4 <sup>a</sup>	22,9±19,1 <sup>a</sup>	6,0±6,1 <sup>a</sup>
$10^{-3}$ (%)	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	80,3±12,8 <sup>b</sup>	35,9±13,4 <sup>a</sup>	19,2±8,5 <sup>a</sup>

Médias com letras iguais, não diferem pelo teste *t* ( $P>0,05$ )

## 5.2 Experimento 2

### *Efeito do SNP na maturação citoplasmática*

Os oócitos tratados com  $10^{-5}$  M de SNP (94,1±6,8%), tiveram uma elevação significativa na migração total dos grânulos corticais, quando comparados ao grupo controle (78,1±11,4%). Esse efeito não foi observado nas concentrações de  $10^{-7}$  M (85,3±11,2%) e  $10^{-9}$  M (82,7±12,5%) que foi semelhante tanto ao controle quanto ao grupo tratado com  $10^{-5}$  M (Tabela 04). O efeito da adição de  $10^{-3}$  M de SNP na migração dos grânulos corticais não foi avaliado, pois os oócitos tratados com esta concentração de SNP não resistiram à fase inicial da técnica quando se adicionava a enzima pronase.

A percentagem de clivagem não foi afetada pelos diferentes tratamentos. Porém, semelhante à migração, a concentração de  $10^{-5}$  M (40,4±15,9%) de SNP, apresentou uma elevação significativa na taxa de blastocistos em relação ao controle (27,2±6,0%) e ao tratamento com  $10^{-7}$  M (26,9±7,7%), mas não se observou diferença quando comparada a concentração de  $10^{-9}$  M (33,4±11,0%), (Tabela 04).

Tabela 04: Efeito da adição de diferentes concentrações de SNP durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre a migração total dos grânulos corticais, clivagem e produção de blastocistos.

Tratamento MIV	n	Migração total (%)	n	CL (%)	BL/T (%)
Controle	87	78,1±11,4 <sup>a</sup>	113	79,2±10,1 <sup>a</sup>	27,2±6,0 <sup>a</sup>
10 <sup>-9</sup>	93	82,7±12,5 <sup>ab</sup>	92	75,8±5,4 <sup>a</sup>	33,4±11,0 <sup>b</sup>
10 <sup>-7</sup>	132	85,3±11,2 <sup>ab</sup>	93	84,9±2,9 <sup>a</sup>	26,9±7,7 <sup>a</sup>
10 <sup>-5</sup>	114	94,1±6,8 <sup>b</sup>	98	80,3±10,6 <sup>a</sup>	40,4±15,9 <sup>b</sup>

Médias com letras iguais, não diferem pelo teste *t* ( $P > 0,05$ )

CL, clivados; BL/T, produção de blastocisto em relação ao número total de oócitos

## 6. DISCUSSÃO

Um aumento na quantidade de dados referentes ao efeito do NO na maturação meiótica de várias espécies de mamíferos, vem sendo feito no decorrer dos últimos anos. Entretanto, o conhecimento total do mecanismo de ação pelo qual o NO exerce esse efeito ainda é desconhecido (BU *et al.*, 2003,2004; KAZUO *et al.*, 2001; JABLONKA-SHARIFF e OLSON, 2000).

No presente estudo, a adição de alta concentração de SNP ( $10^{-3}$  M) no meio de maturação impediu que o oócito progredisse da MI para MII após 24 h de cultivo. Esses resultados estão de acordo com os observados em camundongos (BU *et al.*, 2003), onde foi observada a inibição da extrusão do primeiro corpúsculo polar, quando se utilizou a mesma concentração de SNP. Também foi observado que ao final do período de maturação (24 h), pipetando o COC apenas uma vez, todas as células do *cumulus* se soltavam do oócito, indicando que ocorreu uma interrupção na comunicação entre oócito e células do *cumulus* realizada pelas junções comunicantes (WEBB *et al.*, 2002). Foi demonstrado que o NO exerce ação no citoesqueleto (INGRAM *et al.*, 2000) nos levando a sugerir que a alteração da morfologia da projeção transzonal das células do *cumulus* (ALBERTINI, 2001), pode ter sido causada por uma alteração nos microtúbulos, fazendo com que esta projeção do *cumulus* se retraísse, desfazendo assim as junções comunicantes entre



oócito e células do *cumulus*. Esse resultado corrobora com o observado por BU *et al.* (2004) e nos leva a sugerir que a interrupção desta comunicação pode estar afetando a ação da PK-C. BERTAGNOLLI *et al.* (2004), demonstraram que a ação da PK-C no início da MI é mediada pelas células do *cumulus* e que esta proteína regula a maturação de oócitos coincidindo com os períodos descritos de ativação do MPF, sugerindo que ela seja necessária para que ocorra a ativação do MPF. O NO estimula a atividade da PK-C por meio da produção de GMPc, e a PK-C exerce papel na retomada da meiose via modulação dos níveis de AMPc (BU *et al.*, 2004).

Um outro mecanismo de ação do NO na maturação oocitária, seria a inibição da atividade da MAPK (INGRAM *et al.*, 2000), que é responsável pela manutenção da progressão da meiose (FAN e SUN, 2004). O processo de fosforilação/desfosforilação de proteínas que é mediado por proteínas cinases e proteínas fosfatases, possui um importante papel no ciclo celular meiótico. O MPF e a MAPK, são moléculas chave na regulação da progressão do ciclo celular durante a meiose. O MPF aumenta sua concentração no início da retomada da meiose, e atua diretamente no RVG. Já a MAPK tem sua concentração elevada após o RVG, tendo uma maior atividade na transição de MI para MII (FAN e SUN, 2004). TANNER *et al.* (2000), observaram que o NO modula a expressão de proteínas que participam na regulação do ciclo celular, nos levando a sugerir que o NO em alta concentração, pode estar inibindo a progressão de MI para MII, por meio da modulação de componentes requeridos para que ocorra uma progressão meiótica normal, como a MAPK e MPF, inibindo suas ações e impedindo assim, que esses oócitos completassem a meiose. Contudo, mais experimentos são necessários para se comprovar esta hipótese em oócitos bovinos.

No presente estudo, quando se adicionou no meio de maturação a mesma concentração de SNP que inibiu a progressão de MI para MII, ocorreu uma inibição da expansão total do *cumulus* nos COCs cultivados por 24 h. Está bem estabelecido que a sinalização parácrina do oócito para as células do *cumulus* é essencial para que a sua expansão ocorra. Oócitos de camundongos secretam um fator solúvel que habilita as células do *cumulus* a produzirem moléculas da matriz em resposta ao FSH (BUCCIONE *et al.*, 1990). Isto demonstra que oócitos de camundongos

produzem um fator capacitador da expansão do *cumulus* (CEEF) que é requerido para que a expansão ocorra. A primeira molécula identificada como candidata a ser um CEEF, foi o GDF-9. DRAGOVIC *et al.* (2005), confirmaram a hipótese de que o GDF-9 secretado pelo oócito é uma molécula chave para a regulação da expansão do *cumulus* em camundongos. O fato de que as células do *cumulus* se soltavam facilmente dos oócitos, sugere que houve uma interrupção da comunicação entre oócito e células do *cumulus*, impedindo assim que ocorresse a passagem do fator (GDF-9), produzido no oócito para as células do *cumulus* que habilita as células do *cumulus* a responderem ao estímulo das gonadotrofinas e produzirem hialuronan, levando à expansão das mesmas (SALUSTRI *et al.*, 1990; DRAGOVIC *et al.*, 2005).

Espécies de oxigênio reativo, incluindo o radical superóxido ( $O_2^-$ ), os quais são produzidos como produtos do metabolismo normal, são conhecidos como causadores de danos celulares, levando a célula à morte e injúria tecidual (DINARA *et al.*, 2001). Está bem estabelecido que o NO provoca uma variedade de efeitos intracelulares dependendo da sua concentração, do seu estado reduzido, e da quantidade de íons de metal, thiols, glutamina, e outros alvos nucleofílicos (GROSS e WOLIN, 1995). Este estudo demonstrou que mesmo após a permanência dos COCs por 48 h no meio de maturação, realizando ou não a troca por meio de maturação sem SNP as 24h, a concentração de  $10^{-3}$  M não permitiu que ocorresse a progressão da meiose. Também foi observada uma fácil dissociação das células do *cumulus* do oócito e uma intolerância dos oócitos cultivados nessa concentração ao tratamento com a pronase. Embora não tenha sido avaliada a apoptose em COCs tratados com SNP, esses dados sugerem que oócitos expostos a esta concentração podem estar sofrendo um processo de degeneração celular, confirmando a hipótese de que a concentração de NO pode ser um fator crítico na sobrevivência e função celular (MONCADA e ERUSALIMSKY, 2002).

O primeiro evento da maturação nuclear é o processo de rompimento da vesícula germinativa (RVG), que ocorre, *in vitro*, entre sete e 12 h após o início do cultivo (VIGNOLA *et al.*, 1994). Durante a diacinese, a membrana nuclear começa a sofrer um dobramento, os poros nucleares desaparecem e então a membrana nuclear se fragmenta desaparecendo rapidamente (SZOLLOSI *et al.*, 1972). Neste

estudo durante a cinética da maturação, às 8 h de cultivo, quando o rompimento da vesícula germinativa começou a ser observado, a adição de  $10^{-3}$  M de SNP resultou em uma percentagem de 80,3% de oócitos no estágio de vesícula germinativa, diferindo do que ocorreu no grupo controle (42,5% em VG). Essa diferença não foi observada com 10 e 12 horas de cultivo, levando-nos a concluir que o NO em concentração elevada retarda o início do RVG, mas não tem efeito na progressão para MI.

Oócitos de folículos antrais removidos do ambiente folicular e cultivados *in vitro* em meio adequado, reiniciam espontaneamente a divisão meiótica (MILOVANOV e SIRARD, 1994). Durante o processo de crescimento até a aquisição de competência para o reinício da meiose, o oócito sofre diversas mudanças bioquímicas e estruturais importantes à maturação, fecundação e sustentação do desenvolvimento embrionário (HURK e ZHAO, 2005). No entanto, o percentual de embriões que se desenvolve a partir de oócitos maturados e fecundados *in vitro* é inferior àquele obtido *in vivo*, isso em decorrência de problemas no processo da maturação citoplasmática (BERTAGNOLLI *et al.*, 2004).

A avaliação citoplasmática durante a maturação *in vitro*, foi realizada neste estudo pela observação da migração dos grânulos corticais para a região cortical dos oócitos e pela produção de blastocistos. A adição da concentração de  $10^{-5}$  M de SNP no meio de maturação, aumentou significativamente tanto a migração total dos grânulos corticais quanto a taxa de blastocistos, quando comparado ao controle. Isto nos leva a sugerir que a adição dessa concentração causou um efeito benéfico na maturação citoplasmática devido a um aumento na migração dos grânulos corticais, melhorando a qualidade dos oócitos maturados *in vitro*, e conseqüentemente, aumentando a taxa de blastocistos produzidos *in vitro*. Antes da fertilização, a zona pelúcida (ZP) ao redor dos oócitos de mamíferos atua como uma barreira espécie-específica e está envolvida na ligação do oócito com o espermatozóide. Após a fertilização, a zona passa a ter um papel no bloqueio da poliespermia. A penetração de mais de um espermatozóide no oócito, resulta em anormalidades embrionárias na maioria das espécies (KOLA e TROUSON, 1989; DE VOS e VAN STEIRTEGHEM, 2000). Este bloqueio extracelular à poliespermia é estabelecido após modificações

bioquímicas na ZP, realizada pela liberação do conteúdo dos grânulos corticais no espaço perivitelínico, que é realizado após a fertilização (ABEYDEERA, 2000). HOODBHOY *et al.* (2001), demonstraram que além da importância no bloqueio à poliespermia, proteínas que fazem parte da constituição dos grânulos corticais são requeridas na pré-implantação e no desenvolvimento embrionário.

O NO pode induzir citotoxicidade em diferentes tipos celulares, assim como aumentar a toxicidade de diferentes agentes, podendo causar apoptose celular (MESSMER, *et al.*, 1995). Porém, ele também pode atuar protegendo a célula do estresse oxidativo, servindo assim como um antioxidante (KANNER *et al.*, 1991). Um dos mecanismos de ação do NO como antioxidante pode ser através do controle da síntese de glutathione, um dos mais importantes antioxidantes nas células (MOELLERING *et al.*, 1999). ALI *et al.*, (2003), demonstraram que a ação de antioxidantes durante a maturação pode aumentar a taxa de blastocistos produzidos *in vitro*. BU *et al.*, (2003), observaram que o NO possui um efeito duplo (inibindo ou estimulando) a maturação de oócitos de camundongo, dependendo da sua concentração. No presente estudo, foi observado que a concentração de  $10^{-9}$  M de SNP aumentou significativamente a produção de blastocistos *in vitro* quando comparado ao controle, mas não teve efeito na migração dos grânulos corticais, nos levando a sugerir que o NO nesta concentração esteja atuando por uma via diferente do que a observada na concentração de  $10^{-5}$  M de SNP. Mais estudos são necessários para se avaliar os mecanismos de ação do NO durante a maturação *in vitro* e definir se o NO nesta concentração atua como antioxidante ou não.

Baseados nos resultados apresentados por este estudo, podemos sugerir que o NO em alta concentração ( $10^{-3}$  M de SNP) tem uma ação citotóxica, mas em concentração intermediária ( $10^{-5}$  M de SNP) e baixa ( $10^{-9}$  M de SNP) aumenta a taxa de blastocistos por vias diferenciadas, mostrando que o NO também possui um efeito duplo em oócitos bovinos, inibindo (na concentração de  $10^{-3}$  M) a maturação nuclear e citoplasmática ou estimulando (na concentração de  $10^{-5}$  e  $10^{-9}$  M) a maturação citoplasmática. O entendimento dos mecanismos de controle do NO durante a maturação *in vitro*, poderão abrir novos horizontes para a manipulação farmacológica

da reprodução assistida em animais de interesse zootécnico e em extinção, bem como em humanos.

## 7. CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente estudo nos permitem concluir que:

A adição de  $10^{-3}$  M de SNP:

- bloqueia a progressão para MII e expansão total do *cumulus*
- possui efeito irreversível
- leva a um retardo no RVG às 8 h

A adição de  $10^{-5}$  M de SNP aumentou:

- migração total dos grânulos corticais
- taxa de blastocistos produzidos *in vitro*

A adição de  $10^{-9}$  de SNP, aumentou a taxa de blastocistos produzidos *in vitro*, mas não aumentou a migração dos grânulos corticais

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEYDEERA, L.R. (2000) In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology* 57:256-273.
- 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.
- ALBERTINI, D.F. (1987) Cytoplasmic reorganization during the resumption of meiosis in cultured preovulatory rat oocytes. *Devl. Biol.* 120: 121-131.
- ALBERTINI, D.F.; COMBELLES C.M.; BENECCHI, E.; CARABATSOS, M.J. (2001) Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 121; 647-653.
- ALBERTINI, D.F. (2002) The structural basis of oocyte-granulosa cell communication. *Ernst. Schering. Res. Found. Workshop.* 41:101-110.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTSON, J.D. (1994) Chapter 17: The cell-division cycle. In: *The molecular biology of the cell.* Carland Publishing, Inc. 363-910.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTSON, J.D. (1997) Chapter 19: Junções celulares, adesão celular e a matriz extracelular. In: *Biologia molecular da célula 3.ed. Porto Alegre.* Inc. 949-1010.

- ALI, A.A.; BILODEAU, J.F.; SIRARD, M.A. (2003) Antioxidant requirement for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 59: 939-949.
- ASSEY, R.J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; PURWANTARA, B. (1994) Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol Reprod Dev* 37: 335-344.
- BASINI, G.; BARATTA, M.; PONDERAT, N.; BUSSOLATI, S.; TAMANINI, C. (1998) Is nitric oxide an autocrine modulator of bovine granulosa cell function? *Reprod. Fertil. Dev.* 10:471-478.
- BEACKMAN, J.S., CROW, J.P. (1993) Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem. Soc. Trans.* 21:330-334.
- BEN-SHLOMO, I.; KOKIA, E.; JACKSON, M.J.; ADASHI, E.Y.; PAYNE, D.W. (1994) Interleukin-1 $\beta$  stimulates nitrite production in the rat ovary: evidence for heterologous cell-cell interaction and for insulin-mediated regulation of the inducible isoform of nitric oxide synthase. *Biol. Reprod.* 51:310-318.
- BERTAGNOLLI, A.C., GONÇALVES, P.B.D., GIOMETTI, I.C., COSTA, L.F.S., OLIVEIRA, J.F.C., GONÇALVES, I.D.V., BARRETO, K.P., EMANUELLI, I.P., BORGES, L.F.K. (2004) Interação entre células do cumulus e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.56, n.4, p. 488-496.
- BILLIG, H.; TORSELLI, J.; CARLSON, B.; HILLENSJO, T.; AHREN, K. (1988) Development and function of the reproductive organs. *Ares-Serono Symposia Italy* pp. 161-170.
- BILODEAU, S.; FORTIER, M.A.; SIRARD, M.A. (1993) Effect of adenylate cyclase stimulation on meiotic resumption and cyclic AMP content of zona-free and cumulus-enclosed bovine oocytes in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 97: 5-11.
- BLASHKIV, V.T.; KORNIICHUK, N.A.; VOZNESENSKAYA, Yu.T.; PORNICHENKO, G.A. (2001) Role of nitric oxide in ovulation, meiotic maturation of oocytes, and implantation in mice. *Boll. Exp. Bio. 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.
- BONELLO, N.; McKIE, K.; JASPER, M. *et al.* (1996) Inhibition of nitric oxide effects on interleukin 1 beta-enhanced ovulation rate, steroid hormone and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat. *Biol. Reprod.* 54:436-445.
- BONFOCO, E., KRAINIC, D., ANKARCORONA, 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.
- 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.
- BREDT, D.S.; HWANG, P.M.; GLATT, C.E.; LOWENSTEIN, C.; REED, R.R.; SYNDER, S.H. (1991) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome p-450 reductase. *Nature* 351:714-718.
- BROWN, G.C. (1995) Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 369: 136-139.
- 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., XIE, H., TAO, Y., WANG, J., XIA, G. (2004) Nitric oxide influences the maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes cultured in spontaneous maturation medium and hypoxanthine-supplemented medium through different signaling pathways. *Mol. Cell. Endocr.* 223:85-93.
- BUCCIONE, R., SCHROEDER, A.C., EPPIG, J.J. (1990) Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol. Reprod.* 43:543-7. Review.

- CARABASTOS, M.J.; SELBITTO, C. GOODENOUGH, D.A.; ALBERTINI, D.F. (2000) Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Dev. Biol.* 226: 167-179.
- CARRETE, O.; NEMADE, R.V.; DAY, A.J.; BRICKNER, A.; LARSEN, W.J. (2001) TSG-6 is concentrated in the extracellular matrix of mouse cumulus oocyte complexes through hyaluronan and inter inhibitor binding. *Biol. Reprod.* 65: 301-308.
- CHARI, S.; HILLENSJO, T.; MAGNUSSON, C.; STURM, G.; DAUME, E. (1983) In vitro inhibition of rat oocyte meiosis by human follicular fluid fractions. *Arch. Gynecol.* 233: 155-164.
- CHEN, L.; MAO, S.J.; LARSEN, W.J. (1992) Identification of a factor in fetal bovine serum that stabilizes the cumulus extracellular matrix. A role for a member of the inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor family. *J. Biol. Chem.* 267: 12380-12386.
- CHEN, L.; RUSSELL, P.T.; LARSEN, W.J. (1993) Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Mol. Reprod. Dev.* 34: 87-93.
- CHEN, L.; ZANG, H.; POWERS, R.W.; RUSSELL, P.T.; LARSEN, W.J. (1996) covalent linkage between proteins of the inter- $\alpha$ -inhibitor family and hyaluronic acid is mediated by factor produced by granulosa cells. *J. Biol. Chem.* 271: 19409-19414.
- 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., EISENHAUER, 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.

- CLARKE, P.R.; KARSENTE, E. (1991) Regulation of p 34<sup>cdc2</sup> protein kinase: new insights into protein phosphorylation and cell cycle. *J. Cell Sci.* 100: 509-514.
- CONTI, M., NEMOZ, G., SETTE, C., VIVINI, E. (1995) Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases. *Endoc. Rev.* 16:370-389.
- COOK, J.P., TSAO, P.S. (1993) Cytoprotective effects of nitric oxide. *Circulation.* 88:2451-2454.
- CRAN, D.G., ESPER, C.R. (1990) Cortical granules and the cortical reaction in mammals. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 42: 177-188.
- DAWSON, V.L., DAWSON, T.M. (1996) Nitric oxide in neuronal degeneration. *Proc. Soc. Exp Biol. Med.* 211:33-40.
- DEDIEU, T.; GALL, L.; CROZET, N.; SEVELLEC, C.; RUFFINI, S. (1996) Mitogen-activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. *Mol. Reprod. Dev.* 45: 351-358.
- DE LOOS, F.; VAN VILET, C.; VAN MAURIK, P.; KRUIP, T.A. (1989) Morphology of immature bovine oocytes. *Gam. Res.* 24 :197-204.
- DE VOS, A., VAN STEIRTEGHEM. (2000) Zona hardening, zona drilling and assisted hatching: new achievements in assisted reproduction. *Cell Tiss. Org.* 166:220-227.
- DINARA, S., SENGOKU, K., TAMATE, K., HORIKAWA, M., ISHIKAWA, M. (2001) Effects of supplementation with free radical scavengers on the survival and fertilization rates of mouse cryopreserved oocytes. *Hum. Reprod.* 16:1976-81.
- DIXIT, D. V., PARVIZI, N. (2001) Nitric oxide and the control of reproduction. *Anim Reprod Science*, 65(1-2): 1-21.
- DOREE, M. LABBLE, J.C. PIRCARD, A. (1989) M phase promoting factor: its identification as the M phase specific histone H1 kinase and its activation by phosphorylation. *J. Cell Sci.* 12: 39-51.

- DOWNS, S.M.; COLEMAN, D.L.; EPPIG, J.J. (1985) Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 454-458.
- DOWNS, S.M. (1995) The influence of glucose, cumulus cells, and metabolic coupling on ATP levels and meiotic in the isolated mouse oocyte. *Dev. Biol.* 167, 502.
- DOWNS, S.M., COTTOM, J., HUNZICKER-DUNN, M. (2001) Protein kinase C and meiotic regulation in isolated mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 58:101–115.
- DRAGOVIC, R.A., RITTER, L.J., SCHULZ, S.J., AMATO, F., ARMSTRONG, D.T., GILCHRIST, R.B. (2005) Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology* 146:2798-806.
- DUNPHY, W.G.; NEWPORT, J.W. (1989) Fission yeast p13 blocks mitotic activation and tyrosine dephosphorylation of the *Xenopus* cdc2 protein kinase. *Cell* 58: 181-191.
- EPPIG, J.J. (1979) FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature* 281: 483-484.
- EPPIG, J.J., DOWNS, S.M. (1984) Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol. Reprod.* 30:1-11.
- EPPIG, J.J.; WARD-BAILEY, P.F.; COLEMAN, D.L. (1985) Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biol. Reprod.*, 33: 1041-1049.
- 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. (1991). Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays* 13: 569–574.

- EPPIG, J.J. (1994) Oocyte-somatic cell communication in the ovarian follicles of mammals. *Sem. Devel. Biol.* 5, 51.
- 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-BUSSIÈRE, M.C.; RODRIGUES, J.A.; FONTES, R.S.; ROSA E SILVA, AAM. (2002) Interrelationship between nitric oxide, progesterone and oestradiol-17beta concentrations in follicular fluid of ovarian follicles with follicle-oocyte quality during follicular development in zebu cows (*Bos indicus*). *Theriogenology*, 57: 605.
- FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. (1995) Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol. Reprod. Dev.* 42: 437-442.
- FERRELL, JR. J.E.; WU, M.; GERHART, J.C.; MARTIN, G.S. (1991) "Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and a microtubule-associated protein-2 kinase homolog in *Xenopus* oocytes and eggs." *Mol. Cell. Biol.* 11:1965-1971.
- 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.
- FUJIWARA, T.; NAKADA, K.; SHIRAKAWA, H.; MIYAZAKI, S. (1993) Development of inositol trisphosphate-induced calcium release mechanism during maturation in hamster oocytes. *Dev. Biol.* 156: 69-79.
- GALLI, G., DUCHI, R., GROTTI, G., TURINI, P., PONDERATO, N., COLLEONI, S., LAGUTINA, I., LAZZARI, G. (2003) Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, 59: 599-616.
- GAVIN, A.C.; CAVADORE, J.C.; SCHORDERET-SLATKINE, S. (1994) Histone H1 kinase activity, germinal vesicle breakdown and M phase in mouse oocytes. *J. Cell Sci.* 107: 275-283.

- GAUTIER, J.; NORBURY, C.; LONKA, M.; NURSE, P.; MALLER, J.L. (1988) Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* 54: 433-439.
- GAUTIER, J.; MINSHULL, J.; LONKA, M.; GLOTZER, M. HUNT, T.; MALLER, J.L. (1990) Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* 60: 487-494.
- GLOTZER, M.; MURRAY, A.; KIRSCHENER, M.; (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349: 132-138.
- GOSDEN, R.G.; BOWNES, M. (1995) Gametes- The oocyte. *Cambridge University Press* pp. 23-53.
- 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.
- GRAZUL-BILSKA, A.T.; REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. (1997) Gap junctions in the ovaries. *Biol. Reprod.* 57: 947-957.
- GROSS, S.S., WOLIN, M.S. (1995) Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 57:737-69. Review.
- HACCARD, O.; JESSUS, C.; CAYLA, X.; GORIS, J.; MERLEVEDE, W.; OZON, R. (1990) In vivo activation of a microtubule-associated protein kinase during meiotic maturation of the *Xenopus* oocyte. *Eur. J. Biochem.*;192:633-42.
- HACCARD, O.; LEWELLYN, A.; HARTLEY, R.S.; ERIKSON, E.; MALLER, J.L. (1995) Induction of *Xenopus* oocyte meiotic maturation by MAP kinase. *Dev. Biol.*168:677-82.
- HANKE, C.J.; DREWETT, J.G.; MEYERS, C.R.; CAMPHELL, W.B. (1998) Nitric oxide inhibits aldosterone synthesis by a guanylyl cyclase-independent effect. *Endocrinology* 139:4053-4060.
- HASSOLD, T.J. (1986) Chromosome abnormalities in human reproductive wastage. *Trends Genetics* 1: 105-110.

- HEALD, R.; McKEON, F. (1990) Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* 61: 579-589.
- 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. Reproduct. Dev.* 59: 78-89.
- HOSOE, M., SHIOYA, Y. (1996) Distribution of cortical granules in classified bovine oocyte. *Theriogenology* 45:274.
- HURK, V.D.R., ZHAO, J. (2005) Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63:1717-1751.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. (1997) Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47: 23-32.
- 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.; OLSON, L.M. (1997) Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* 138:460-468.
- 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.

- 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. (2000) Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine *cumulus*-oocyte complexes *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 55:412-421.
- JOSEFSBERG, L.B.; GALIANI, D.; LAZAR, S.; KAUFMAN, O.; SEGER, R.; DEKEL, N. (2003) Maturation promoting factor governs mitogen-activated protein kinase activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. *Biol. Reprod.* 68: 1282-1290.
- KANNER, J., HAREL, S., GRANIT, R. (1991) Nitric oxide as an antioxidant. *Arch. Biochem. Biophys.* 289: 130-136.
- KAZUO, S.K.; NAOYUKI, T.; MICHIHARU, H.K.; KEIKO, T.; HARUMI, K.; DINARA, S.; KENICHI, T.; MUTSUO, I. (2001) Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 58:262-268.
- KILBOURN, R.G.; GROSS, S.S.; JUBRAN, A.; ADAMS, J. GRIFFITH, O.W.; LEVI, R.; LODATO, R.F. (1990) N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3629-3632.
- 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.
- KIM, N.H.; CHO, S. K.; CHOI, S. H.; KIM, E. Y.; PARK, S. PILL.; LIM, J. H. (2000) The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes *in vitro* maturation. *Zygote*, 8: 25-32.
- KNIJN, H. M.; GJORRET, J. O.; VOS, P.L.A.M.; HENDRIKSEN, P.J.M.; VAN DER WEIJDEN, B.C.; MADDOX-HYTTEL, P.; DIELEMAN, S.J. (2003) Consequences



- of In Vivo Development and Subsequent Culture on Apoptosis, Cell Number, and Blastocyst Formation in Bovine Embryos. *Biol. Reprod.* 69(4):1371-1378.
- KOLA, I., TROUNSON, A. (1989) Dispermic human fertilization: violation of expected cell behaviour. In: Schatten, H., Schatten, G. (Eds.) *The Cell Biology of Fertilization*. Academic Press, New York p. 277-293.
- KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; FULKA, J.J.; PROCHAZKA, R.; RIMKEVIKOVA, Z.; FULKA, J. (1988) Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. *Gam. Res.* 19: 423-431.
- KURTZ, A., GOTZ, K.H., HAMANN, M., WAGNER, C. (1998) Stimulation of rniin secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3. *Proc. Nat. Acad. Sc. USA* 95:4743-4747.
- KUYT, J.R.M; KRUIP, T.A.M.; DE JONG-BRINK, M. (1988) Cytochemical localization of adenylate cyclase in bovine cumulus-oocyte complexes. *Exp. Cell Res.*, 174: 139-145.
- KRAGER, K. (2003) Just sit back and relax with sodium nitroprusside. *Department of free radical and radiation biology.* 77:222.
- KRUIP, T.A.M.; CRAN, D.G.; VAN BENEDEN, T.H.; DIELEMAN, S.J. (1983) Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. *Gamete Res* 8;29-47.
- LABBE, J.C.; CAPONY, J.P.; CAPUT, D.; CAVADORE, J.C.; DERANCOURT, J.; KAGHAD, M.; LELIAS, J.M.; PICARD, A.; DOREE, M. (1989) MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *EMBO J.* 8: 3053-3058.
- LÉNÁRT, P.; ELLENBERG, J. (2003) Nuclear dynamics in oocytes: from germinal vesicle breakdown to mitosis. *Cur. Opin. Cell Biol.* 15: 88-95.
- 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.

- MATTA, S. G. C., BUSSIERE, 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.
- McCANN, S.M.; KIMURA, M.; KARANTH, S.; YU, W.H.; RETTORI, V. (1997) Nitric oxide controls the hypothalamic-pituitary response to cytokines. *Neuroimmunomodulation* 4:98-106.
- MESSMER, U.K., ANKARCORONA, 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.
- MILOVANOV, C.; SIRARD, M.A. (1994) Manipulation of chromosome condensation by protein synthesis inhibitors and cyclic AMP during maturation of bovine oocytes. *Theriogenology* 41:819-827.
- 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.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. (1991) nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.
- MONCADA S, ERUSALIMSKY JD. (2002) Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3:214-220.
- MOTLIK, J.; CROZET, N.; FULKA, J. (1984) Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fertil.* 72: 323-328.
- MOTTA, P.M.; MAKABE, S.; NAGURO, T.; CORRER, S. (1994) Oocyte follicle cells association during development of human ovarian follicle. A study by high resolution scanning and transmission electron microscopy. *Arch. Histol. Cytol.* 57: 369-394.

- MOTTA, A.B.; ESTEVEZ, A.; TOGNETTI, T.; GIMENO, M.F.; FRANCHI, A.M. (2001) Dual effects of nitric oxide in functional and regressing rat corpus luteum. *Mol. Hum. Reprod.* 7:43-47.
- MUKHOPADHYAY, D.; HASCALI, V.C.; DAY, A.J.; SALUSTRI, A.; FULOP, C. (2001) Two distinct populations of tumor necrosis factor stimulated gene-6 protein in the extracellular matrix of expanded mouse cumulus cell-oocyte complexes. *Arch. Biol. Chem. Biophys.* 39: 173-181.
- MURRAY, A.W.; SOLOMEN, M.J.; KIRSCHNER, M.W. (1989) The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* 339: 280-286.
- NAKAMURA, Y.; ONO, M.; NAKATA, M.; et al. (1996) Nitric oxide synthase (NOS) activity in the ovary during ovulation in immature rats injected with pregnant mare serum gonadotropin (PMSG)-human chorionic gonadotropin (hCG) (Abstr.). *Biol. Reprod.* 54:68.
- NAKAMURA, Y.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N.; TAKAYAMA, H.; KATO, H. (2002) Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biol. Reprod.* 67: 1588-1592.
- NATHAN, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6:3051-3064.
- NORMAN, J.E.; CAMERON, I.T. (1996) Nitric oxide in the human uterus. *Rev. Reprod.* 1:61-68.
- OCHSMER, S.A.; RUSSELL, D.L.; DAY, A.J.; BREYER, R.M.; GOMER, R.H.; RICHARDS, J.S. (2003a) Decreased expression of tumor necrosis factor stimulated gene-6 in cumulus cells of the cyclooxygenase-2 EP2 null mice. *Endocr.* 144:1008-1019.
- OCHSMER, S.A.; DAY, A.J.; BREYER, R.M.; RUGG, S.M.; GOMER, R.H.; RICHARDS, J.S. (2003b) Disrupted function of tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated gene 6 blocks cumulus cell-oocyte complex expansion. *Endocrinology* 144: 4876-4884.

- OLSON, L.M.; JABLONKA-SHARIFF, A.; SALVEMINI, D.; MASFERRER, J. (1996) Inhibitors of nitric oxide synthase (NOS) lower ovulation rate: interaction between nitric oxide and prostaglandin synthesis (Abstr.). *Eleventh Ovarian Workshop* 43.
- OLSON, L. M.; JABLONKA-SHARIFF, A.; BELTSOS, A. N. (1999) Ovarian nitric oxide: a modulator of ovulation and oocyte maturation. In: ADASHI, F. Y., editor. *Ovulation: involving scientific and clinical concepts*. New York: *Springer-Verlag Inc.*, p. 243-264.
- 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.
- PALMER, R.M.J.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333:664-666.
- PARKER, L.L.; ATHERTON-FESSLER, S.; LEE, M.S.; OGG, S.; FALK, J.L.; SWENSON, K.I.; PIWNICA-WORMS, H. (1991) Cyclin promotes the tyrosine phosphorylation of p34<sup>cdc2</sup> in a wee1+ dependent manner. *EMBO J.*, 10: 1255-1263.
- PETER, M.; NAKUGAWA, J.; DOREE, M.; LABBE, J.C.; XIGG, E.A. (1990) In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylations of lamina by cdc2 kinases. *Cell* 61: 591-602.
- PINES, J.; HUNTER, R.H. (1989) Isolation of human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34<sup>cdc2</sup>. *Cell* 58: 833-846.
- PLACHOT, M.; CROZET, N. (1992) Fertilization abnormalities in human in vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 7 *Suppl.* 1: 89-94
- PURCELL, T.L.; GIVEN, R.; CHWALISZ, K.; GARFIELD, R.E. (1999) Nitric oxide synthase distribution during implantation in the mouse. *Mol. Hum. Reprod.* 5:467-475.

- 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.
- RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. (2002) Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev.*, 61: 234-248.
- 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.
- ROZINEK J, PETR J, GROCHOLOVA R, JILEK F. (1995) Microtubule rearrangement during *in vitro* maturation of pig oocytes. Effect of cycloheximide. *Reprod. Nutr. Dev.* 35(6):685-94.
- RUSSELL, D.L.; OCHSNER, S.A.; HSIEH, M.; MUIDERS, S.; RICHARDS, J.S. (2003) Hormone regulated expression and localization of versican in the rodent ovary. *Endocrinology* 144: 1020-1030.
- SALUSTRI, A., ULISSE, S., YANAGISHITA, M., HASCALL, V.C. (1009) Hyaluronic acid synthesis by mural granulosa cells and cumulus cells *in vitro* is selectively stimulated by a factor produced by oocytes and by transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* 265:19517-23.
- SALVEMINI, D.; MISKO, T.P.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, D.; CURRIE, M.G.; NEEDLEMAN, P. (1993) Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7240-7244.
- SATO, E.; KOIDE, S.S. (1987) Biochemical transmitters regulating the arrest and resumption of meiosis in oocyte. *Int. Rev. Cytol.* 106:1-33.
- 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.

- SCHMIDT, H. H. H. W.; LOHMANN, S. M.; WALTER, U. (1993) The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta.* 1178:153-175.
- SESSA, W.C. (1994) The nitric oxide synthase family of proteins. *J. Vasc. Res.* 31:131-143.
- 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.
- 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(13): 7212–7217.
- 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.; MAYES, M. (1998) Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology* 49: 483-497.
- SIRARD, M.A., DUFORT, I., COENEN, K., TREMBLAY, K., MASSICOTTE, L., ROBERT, C. (2003) The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. *Reprod Suppl.* 61:117-29. Review.
- SORENSEN, R.A.; WASSARMAN, P.M. (1976) Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev. Biol.* 50: 531-536.
- STAMLER, J.S. (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78:931-936.
- 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.

- SU, Y.Q.; DENEGRÉ, J.M.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.L.; O'BRIEN, M.J.; EPPIG, J.J. (2003) Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK 1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex. *Dev. Biol.* 263: 126-138.
- 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., FAN, H.Y. (2004) Activity of MAPK/p90rsk during fertilization in mice, rats, and pigs. *Mol. Biol.* 253:293-304.
- SZOLLOSI, D.; CALARCO, P.; DONAHUE, R. (1972) The nuclear envelope: its breakdown and fate in mammalian oogonia and oocytes. *Anat. Rec.* 174.
- SYNDER, S.H. (1995) Nitric oxide. No endothelial NO [news; comment]. *Nature* 377:196-197.
- TAN, X.; CHEN, D.Y.; YANG, Z.; WANG, Y.C.; LI, M.Y.; SCHATTEN, H.; SUN, Q.Y. (2001) Phosphorylation of p90rsk during meiotic maturation and parthenogenetic activation of rat oocytes: correlation with MAP kinases. *Zygote* 9: 269-276.
- TANNER, F.C., MEIER, P., GREUTERT, H., CHAMPION, C., NABEL, E.G., LUSCHER, T.F. (2000) Nitric oxide modulates expression of cell cycle regulatory proteins: a cytostatic strategy for inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 101:1982-9.
- TAO, M.; KODAMA, H.; KAGABU, S.; et al. (1997) Possible contribution of follicular interleukin-1 $\beta$  to nitric oxide generation in human pré-ovulatory follicles. *Hum.Reprod.* 12:2220-2225.
- 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 pathways in rat macrophages. *J. Biol. Chem.* 270:6017-6021.

- THOMPSON, J.G.; GARDNER, D.K.; PUGH, P.A.; McMILLAN, W.H.; TERVIL, H.R. (1995) Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biol. Reprod.* 53: 1385-1391.
- TORNELL, J., BILLIG, H., HILLENSSJO, T. (1991) Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides. *Human Reprod.* 6:411-422.
- TSAFRIRI, A.; CHANNING, C.P. (1975) Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 43: 149-52.
- TSAFRIRI, A. (1988) Local nonsteroidal regulators of ovarian function. In: Knobil E, Neill J. et al (eds) *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York pp 527-565.
- TSAFRIRI, A.; ADASHI, E.Y. (1994) *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York pp. 817-860.
- VAN VOORHIS, B.J.; DUNN, M.S.; SNYDER, G.D.; WEINER, C.P. (1994) Nitric oxide: an autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis. *Endocrinology*, Nov;135:1799-806.
- VAN VOORHIS, B.J.; MOORE, K.; STRIJBOS, P.J.L.M.; et al. (1995) Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary. *J. Clin. Invest.* 96:2719-2726.
- VERLHAC, MH.; PENNART, H.D.; MARO, B.; COBB, M.H.; CLARKE, H.J. (1993) MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.* 158: 330-340.
- VERLHAC, MH.; 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.
- VIGNOLA, A.H., PRADO, A., VALENTE, A. (1994) Técnicas de coloração cromossômica para estádios específicos da maturação nuclear de oócitos bovinos. *Ciê. Rur.* v. 24 p.583-589.



- 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.
- WARD, G.E.; KIRSCHNER, M.W. (1990) Identification of cell cycle-regulated phosphorylation sites on nuclear lamin C. *Cell* 61: 561-577.
- WASSERMAN, P.M.; ALBERTINI, D.F. (1994) The physiology of reproduction. *Raven Press New York* pp 79-122.
- WEBB, R.J., MARSHALL, F., SWANN, K., CARROLL, J. (2002) Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in [cAMP] and protein kinase a in mammalian oocytes. *Dev Biol.* 246:441-54.
- WIERSMA, A.; HIRSCH, B.; TSAFRIRI, A.; HANSEN, R.G.; VAN DE KANT, M.; KLOOSTERBOER, H.J.; CONTI, M.; HSUEH, A.J. (1998) Phosphodiesterase 3 inhibitors suppress oocyte maturation and consequent pregnancy without affecting ovulation and cyclicity in rodents. *J. Clin. Invest.* 102: 532–537.
- YAMAUCHI, J.; MIYAZAKI, T.; IWASAKI, S.; KISHI, I.; KUROSHIMA, M.; TEI, C.; YOSHIMURA, Y. (1997) Effects of nitric oxide on ovulation and ovarian steroidogenesis and prostaglandin production in the rabbit. *Endocrinology.* 138:3630-3637.
- YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M. BOLS, P.E.; PRESICCE, G.A. (1998) Control of oocyte maturation in cows-biological factors. *Theriogenology* 49: 471-482.
- 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. M.* 36:462-486.
- ZACKRISSON, U.; MIKUNI, M.; WALLIN, A.; DELBRO, D.; HEDIN, L.; BRANNSTROM, M. (1996) Cell-specific localization of nitric oxide synthases (NOS) in the rat ovary during follicular development, ovulation and luteal formation. *Hum. Reprod.* 11:2667-2673.

ZINI, A.; O'BRYAN, M.K.; MAGID, M.S.; SCHLEGEL, P.N. (1996)  
Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol. Reprod.* 55:935-41.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)