



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CAMPUS DE SOBRAL - CURSO DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGb**

**FRANCISCO TAIÃ GOMES BEZERRA**

**EFEITOS DA CILOSTAMIDA E DAS METADES FOLICULARES NO BLOQUEIO  
DA RETOMADA DA MEIOSE E NO NÍVEL DE AMP<sub>c</sub> EM OÓCITOS BOVINOS**

**SOBRAL - CEARÁ**

**2014**

**FRANCISCO TAIÃ GOMES BEZERRA**

**EFEITOS DA CILOSTAMIDA E DAS METADES FOLICULARES NO BLOQUEIO  
DA RETOMADA DA MEIOSE E NO NÍVEL DE AMPc EM OÓCITOS BOVINOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
– Curso de Medicina, da Universidade Federal  
do Ceará como requisito parcial para obtenção  
do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de  
concentração: Macromoléculas

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Viana  
Silva.

**SOBRAL - CEARÁ**

**2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca do Curso de Medicina – *Campus* de Sobral

- 
- B469e Bezerra, Francisco Taiã Gomes.  
Efeito da cilostamida e das metades foliculares no bloqueio da retomada da meiose e no nível de AMPC em oócitos bovinos. / Francisco Taiã Gomes Bezerra. – 2014.  
67 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2014.  
Área de Concentração: Macromoléculas.  
Orientação: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva.

1. Meiose 2. Oócitos. I. Título.

---

CDD 572

**FRANCISCO TAIÃ GOMES BEZERRA**

**EFEITO DA CILOSTAMIDA E DAS METADES FOLICULARES NO BLOQUEIO DA  
RETOMADA DA MEIOSE E NO NÍVEL DE AMPc EM OÓCITOS BOVINOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Macromoléculas

**Aprovada em** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**Conceito obtido:** \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José Roberto Viana Silva – Orientador  
(Universidade Federal do Ceará – UFC)

---

Profa. Dra. Márcia Viviane Alves Saraiva  
(Universidade Federal do Ceará- UFC)

---

Prof. Dr. João Gárcia Alves Filho  
(Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA)

*Dedico esse trabalho às pessoas mais importantes de minha vida.*

*Aos meus pais, Jocélio e Aparecida.*

*Minha tia, Francisca Rodrigues.*

*Meus irmãos, Taisa e Tércio.*

*Minha namorada, Lizandra Albuquerque.*

*Com amor, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, acima de tudo, por sua presença constante em minha vida e por revelar-se a mim em todos os momentos. Agradeço ao Criador por me dá discernimento para entender a sua palavra, por me fazer forte quando estou fraco, por guiar meu caminho me colocando sempre no lugar certo e ao lado das pessoas certas. Obrigado Senhor por ser teu escolhido, por desfrutar sempre da Tua Santa bondade e por me mostrar que *TUDO POSSO NAQUELE QUE ME FORTALECE!*

Aos meus amados pais, Jocélio Aguiar Bezerra e Maria Aparecida Gomes Bezerra, pelo amor, cuidado e apoio constante e incondicional, pela educação e valores ensinados e por serem o espelho com o qual tive por base os princípios dignos de um bom cidadão. Obrigado por cada palavra de incentivo, por cada olhar que muitas vezes falaram mais que mil palavras.

Aos meus irmãos, Taisa Maria Gomes Bezerra e Tércio Gomes Bezerra, e também à tia, Francisca Rodrigues de Paula, por todo amparo e proteção que me encerram, pela força e otimismo que me transmitem, pelo companheirismo, admiração e principalmente pelo enorme carinho e amor que nos une, fortalecendo todos os dias nossos laços familiares.

A minha namorada, Lizandra Albuquerque da Silva, pela compreensão, apoio, carinho, paciência, amor incondicional, sem os quais não teria conseguido vencer os momentos de saudade. Obrigado por sempre me fazer acreditar que sou capaz, por me transmitir a confiança necessária para realização dos meus sonhos, e especialmente por fazer dos meus sonhos “os nossos sonhos”. Eu amo você.

Agradeço a toda minha família e amigos, que de forma direta ou indireta me apoiaram, e me mostraram que eu sempre posso contar com vocês. Eu não seria o mesmo sem as orações de vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Roberto Viana Silva, pela oportunidade de trabalhar em sua equipe e pelo exemplo de profissional e de pessoa. Obrigado pela contribuição dada a minha formação profissional durante o período de mestrado, pela admiração que tenho por sua dedicação à Ciência, pelos conhecimentos transmitidos, confiança, amizade e ética.

Aos Professores, Dr. Paulo Bayard Dias Gonçalves e Dr. João Francisco Coelho (*in memorian*), pelo exemplo de profissionais de sucesso. Agradeço por todas as discussões e sugestões, por toda dedicação e apoio dado à realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Márcia Viviane Alves Saraiva, pela forte contribuição em minha formação profissional, por ser um exemplo de pessoa e profissional e por me estimular sempre à busca do conhecimento. Seus conselhos foram fundamentais para o alcance do sucesso deste trabalho.

A equipe do laboratório de Cultivo de Células e Tecidos, Jackson Costa, Amélia Costa, Ellen Vasconcelos, Juliane Passos, Moemia Portela, Rodrigo Rossi, Renato Passos, Regislane Ribeiro, Gisvani Lopes, Tânia Lopes, Glaucinete Borges e Katianne Freitas, pela oportunidade de trabalhar com vocês e de compartilhar a amizade, carinho e apoio constante. Vocês tornam os dias difíceis de trabalho mais agradáveis. Em especial, ao amigo Anderson Weiny, pela convivência nestes últimos oito meses, por sempre estar disposto a repassar seus conhecimentos científicos e pela enorme capacidade de agilizar a resolução dos problemas.

Agradeço a toda a equipe do BioRep, em especial aos amigos: Vitor Braga, Paulo Antunes, Matheus Cesaro, Werner Glanzner, Melânia Lazzari e Andressa Minussi pela parceria de trabalho e, principalmente, por me proporcionarem a virtude do trabalho em equipe. Sem vocês, esse sonho teria sido difícil de ser concretizado.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de realização de um Curso de Mestrado de nível reconhecido e de qualidade e seriedade inquestionáveis.

Ao Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS), pela disponibilidade de equipamentos e todo o apoio técnico necessário à realização de minha pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro para as pesquisas e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos durante a realização do Curso de Mestrado, fundamentais para a concretização de minhas atividades de pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB) da UFC, pela capacitação profissional que me concederam.

Agradeço também a todos os funcionários da UFC, pelo carinho com que cuidam da Universidade, contribuindo para o sucesso do Curso de Mestrado.

Agradeço, enfim, a todas as pessoas que contribuíram, direto ou indiretamente, para a efetivação deste sonho.

A todos, muito obrigado!

*“Tudo o que fizerem, seja em palavra seja  
em ação, façam-no em nome do Senhor Jesus,  
dando por meio dele graças a Deus Pai.”*

*Colossenses 3:17*

## RESUMO

Os objetivos deste estudo foram: (1) avaliar os efeitos da cilostamida e das metades foliculares sobre o bloqueio da retomada da meiose de oócitos *in vitro* no complexo *cumulus* oócito bovinos (COC), (2) investigar a reversibilidade do efeito da cilostamida na retomada da meiose, e (3) quantificar os níveis de AMPc em COCs, oócitos desnudos (OD) e células do *cumulus* (CC) após o cultivo de COCs na presença de cilostamida e metades foliculares. Para este fim, os oócitos de bovino foram submetidos a um período de pré-maturação de 12 h em meio contendo 10  $\mu$ M cilostamida, metades foliculares ou combinação de ambos e, em seguida, submetidos a maturação *in vitro*. Para avaliar a reversibilidade do efeito da cilostamida, no final deste período de cultura, COC foram lavados e colocados em meio de maturação, sem cilostamida por 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas. Para avaliar os níveis de AMPc, COCs submetidos a pré-maturação por 6 h foram utilizados para a quantificação do nível de AMPc. Após 12 horas de cultivo, grupos de COCs foram fixados para avaliar a configuração da cromatina e progressão da meiose. Os resultados mostraram que COCs cultivados em presença de cilostamida e metades foliculares apresentaram percentuais significativamente maiores de oócitos em vesícula germinativa (94%), depois de um período de 12 h de pré-maturação, do que COCs cultivados em outros tratamentos. Após o bloqueio, 75% dos oócitos atingiram metáfase II após 16 horas de maturação, enfatizando que o tratamento não é tóxico para os oócitos. Além disso, os oócitos cultivados em meio contendo cilostamida e metades foliculares tinham níveis significativamente mais elevados de AMPc quando comparado com outros tratamentos. Concluiu-se que a cilostamida e metades foliculares interagem e promovem a manutenção de oócitos no estágio de vesícula germinativa, aumentando os níveis de AMPc em COCs cultivados.

**Palavras-chave:** maturação oocitária, bloqueio da meiose, cilostamida, metades foliculares.

## ABSTRACT

The aims of this study were (1) to evaluate the effects of cilostamide and follicular hemisections on the blockage of *in vitro* oocyte meiotic resumption in bovine *cumulus* oocyte complexes (COCs), (2) to investigate the reversibility of cilostamide effect on meiotic resumption, and (3) to quantify the levels of cAMP in COCs, denuded oocytes (DO) and cumulus cells (CC) after culturing COCs in presence of cilostamide and follicular hemisections. To this end, bovine oocytes were subjected to a pre-maturation period of 12 h in medium containing 10  $\mu$ M cilostamide, follicular hemisections or combination of both and, then, submitted to *in vitro* maturation. To evaluate the reversibility of cilostamide effect, at the end of this culture period, COCs were washed and placed in maturation medium without cilostamide for 12, 14, 16, 18, 20, 22 and 24 hours. To investigate the levels of cAMP, COCs subject to pre-maturation for 6 h were used to measure the levels of cAMP. After 12 hours of culture, groups COCs were fixed to assess chromatin configuration and meiotic progression. The results showed that COCs cultured in presence of cilostamide and follicular hemisections had significantly higher percentages of oocytes at germinal vesicle stage (94%), after a period of 12 h of pre-maturation, than COCs cultured in other treatments. After blocking treatment, 75% of oocytes reached metaphase II after 16 h of maturation, emphasizing that the treatment is not toxic to oocytes. Moreover, oocytes cultured in medium containing cilostamide and follicular hemisections had significantly higher levels of cAMP when compared to other treatments. It is concluded that cilostamide and follicular hemisections interact and promotes the maintenance of oocytes at germinal vesicle stage by increasing the levels cAMP in cultured COCs.

**Keywords:** oocyte maturation, meiosis block, cilostamide, follicular hemisections.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DE LITERATURA

|           |                                                                                |    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1. | Caracterização morfológica da foliculogênese                                   | 21 |
| FIGURA 2. | Caracterização da maturação nuclear                                            | 27 |
| FIGURA 3. | Reorganização das organelas citoplasmáticas durante a maturação citoplasmática | 28 |
| FIGURA 4. | Vias de sinalização envolvidas no controle da maturação                        | 32 |

### ARTIGO I

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURE 1. | Percentage of oocytes maintained at the germinal vesicle stage (G.V) after 12 h of culture. Different lower case letters (a / b / c) represent significant differences between treatments ( $p < 0.05$ ).                                                                         | 52 |
| FIGURE 2. | Evaluation of reversibility of treatment in blocking the resumption of meiosis. (A) Control; (B) Cilostamide + Follicular hemisections.                                                                                                                                           | 52 |
| FIGURE 3. | Measurement of cAMP levels in oocytes bovines after 6 hours of cultured. (A) oocyte <i>cumulus</i> complex (CCO); (B) <i>cumulus</i> cell (CC); (C) desnuded oocytes (OD). Distinct upper case letters (A/B) represent significant differences between treatments ( $P < 0.05$ ). | 53 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                 |                                                                 |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------|
| AI              | Anáfase I                                                       |
| AMPC/cAMP       | Adenosina monofosfato cíclico                                   |
| AC              | Adenilatociclase                                                |
| ANOVA           | Analysis of variance                                            |
| BSA             | Albumina sérica bovina                                          |
| BIOREP          | Laboratório de Biotecnologia da Reprodução                      |
| CAPES           | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior     |
| CC              | Células do <i>cumulus</i>                                       |
| CCO's / COCs    | Complexo <i>cumulus</i> -oócito / <i>Cumulus</i> oocyte-complex |
| °C              | Graus Celsius                                                   |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de carbono                                              |
| CNPq            | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico   |
| CGP             | Células germinativas primordiais                                |
| OD              | Oócito desnudo                                                  |
| EIA             | Enzyme immunoassay                                              |
| ERK-1           | Extracellular signal-regulated – 1                              |
| ERK -2          | Extracellular signal-regulated – 2                              |
| FIV             | Fertilização <i>in vitro</i>                                    |
| FSH             | Hormônio folículo estimulante                                   |
| FSHr            | Receptor do hormônio folículo estimulante                       |
| GVBD            | Germinal vesicle breakdown                                      |
| GPR-3           | G-protein coupled receptor -3                                   |

|       |                                                |
|-------|------------------------------------------------|
| HCl   | Ácido Clorídrico                               |
| IGF-1 | Fator de crescimento semelhante à insulina – 1 |
| IGFBP | Proteína ligadora de IGF                       |
| IBMX  | 3-Isobutyl-1-methylxanthine                    |
| IU    | Unidades Internacionais                        |
| KD    | Quilodalton                                    |
| LH    | Hormônio Luteinizante                          |
| LHr   | Receptor doHormônio Luteinizante               |
| M     | Molar                                          |
| MAPK  | Mitogen-activated protein kinase               |
| RNA   | Ácido ribonucleico                             |
| RNAm  | Ácido ribonucléico mensageiro                  |
| RVG   | Ruptura da vesícula germinativa                |
| SAS   | Statistical analysis software                  |
| SD    | Standard deviation (Desvio Padrão)             |
| VG/GV | Vesícula germinativa                           |
| XIAP  | X-linked inhibitor of apoptosis                |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                  |                               |
|------------------|-------------------------------|
| ±                | Mais ou menos o desvio padrão |
| %                | Porcentagem                   |
| ~                | Aproximadamente               |
| ml               | Mililitro                     |
| mm               | Milímetro                     |
| mM               | Milimolar                     |
| μm               | Micrômetro                    |
| μM               | Micromolar                    |
| μg               | Micrograma                    |
| H <sub>2</sub> O | Água                          |

## SUMÁRIO

|                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                      | <b>16</b> |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                           | <b>18</b> |
| <b>2.1. OOGÊNESE .....</b>                                     | <b>18</b> |
| <b>2.2.FOLICULOGÊNESE.....</b>                                 | <b>19</b> |
| 2.2.1. Folículos pré-antrais.....                              | 19        |
| 2.2.2. Folículos antrais.....                                  | 21        |
| <b>2.3. RECRUTAMENTO, SELEÇÃO E DOMINÂNCIA.....</b>            | <b>22</b> |
| <b>2.4. MATURAÇÃO OOCITÁRIA.....</b>                           | <b>24</b> |
| 2.4.1. Maturação Nuclear <i>in vitro</i> .....                 | 25        |
| 2.4.2. Maturação Citoplasmática <i>in vitro</i> .....          | 27        |
| <b>2.5. IMPORTÂNCIA DAS CÉLULAS FOLICULARES PARA MATURAÇÃO</b> | <b>29</b> |
| <b>2.6. BLOQUEIO DA RETOMADA DA MEIOSE .....</b>               | <b>30</b> |
| <b>3. PROBLEMA E HIPÓTESES .....</b>                           | <b>33</b> |
| <b>4. JUSTIFICATIVA.....</b>                                   | <b>34</b> |
| <b>5. OBJETIVOS .....</b>                                      | <b>35</b> |
| 5.1. Objetivos Gerais .....                                    | 35        |
| 5.2. Objetivos Específicos .....                               | 35        |
| <b>6. ARTIGO I .....</b>                                       | <b>36</b> |
| <b>7. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>                              | <b>54</b> |
| <b>8. PERSPECTIVAS .....</b>                                   | <b>55</b> |
| <b>9. REFERÊNCIAS .....</b>                                    | <b>55</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Em bovinos, o período peri-ovulatório é liderado pelo pico pré-ovulatório de LH, o qual estimula a retomada da meiose oocitária e culmina com a ovulação, *in vivo*. *In vitro*, a maturação meiótica ocorre logo após a retirada do oócito de folículos antrais, geralmente antes da divergência folicular, entre 3 e 8 mm (FAIR *et al.*, 1995), o que diminui o período de obtenção da competência oocitária. A competência oocitária representa a capacidade do oócito completar a maturação, submeter-se a fertilização bem sucedida e alcançar o estágio de blastocisto (ASSIDI *et al.*, 2008). Considerando que baixas taxas de capacitação oocitária são obtidas *in vitro*, diversos estudos têm sido realizados para a obtenção de mecanismos que atuem no bloqueio da retomada espontânea da meiose com o objetivo de proporcionar mais tempo para os oócitos desenvolverem competência meiótica completa, resultando em oócitos de melhor qualidade. A detenção prolongada de oócitos na prófase I da meiose e subsequente retomada da meiose está correlacionado com os níveis intra-oocitários do mensageiro secundário 3' 5'-monofosfato adenosina cíclico (AMPC) (KAWAMURA *et al.*, 2011). Dessa maneira, o uso de substâncias que mantenham altas concentrações de AMPC no interior do oócito, como a cilostamida (BILODEAU-GOESEELS, 2012; ALBUZ *et al.*, 2010; SHU *et al.*, 2008) tem contribuído para o bloqueio da retomada da meiose *in vitro*. A cilostamida é um bloqueador específico da enzima fosfodiesterase 3 que está presente no oócito. Os efeitos de cilostamida no desenvolvimento *in vitro* tem sido estudado em humanos (SHU *et al.*, 2008; VANHOUTTE *et al.*, 2008; VANHOUTTE *et al.*, 2009), bovinos (LUCIANO *et al.*, 2011; ALBUZ *et al.*, 2010), ovinos (ROSE *et al.*, 2013) e camundongos (NOGUEIRA *et al.*, 2003; VANHOUTTE *et al.*, 2008; ALBUZ *et al.*, 2010; JEE *et al.*, 2009).

Outro método que tem sido bastante estudado é o cocultivo de COCs com metades foliculares. Estudos realizados com a utilização de metades foliculares indicam que essas células produzem fatores que inibem a progressão da meiose oocitária. Em bovinos, o cultivo com metades foliculares manteve uma percentagem de 60% de oócitos em bloqueio meiótico após 24 horas de cultivo (RICHARD & SIRARD, 1996). Esse modelo utilizado para estudar o reinício da meiose oocitária é bem estabelecido (GIOMETTI *et al.*, 2005; BARRETA *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2012b), pois as células da teca e da granulosa fisiologicamente mantêm os oócitos em prófase I até o pico de LH (AYALON *et al.*, 1972). Esse fato pode ser evidenciado pela manutenção de oócitos em VG quando co-cultivados com

metades foliculares ou em meio condicionado por estas células (SIRARD E FIRST, 1988; RICHARD E SIRARD, 1996; GIOMETTI *et al.*, 2005; BARRETA *et al.*, 2008).

Para um melhor entendimento da importância deste trabalho, segue uma breve revisão de literatura onde serão abordados aspectos relacionados à oogênese, foliculogênese, recrutamento, seleção e dominância, maturação oocitária, importância das células foliculares para a maturação oocitária e bloqueio da maturação oocitária.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 OOGÊNESE

A oogênese pode ser definida como um processo celular, molecular e fisiológico que envolve a formação, o crescimento e a maturação do oócito que tem início na vida intra-uterina e termina após a fertilização. Na maioria dos mamíferos, a oogênese começa com a formação das células germinativas primordiais (CGPs), cuja origem é extragonadal, do endoderma primitivo, sendo oriundas da porção caudal da linha primitiva e do saco vitelínico adjacente (WASSARMAN e ALBERTINI *et al.*, 1994). Em vacas este evento pode ser observado no 35º dia de gestação (ERICKSON *et al.*, 1966). As células germinativas primordiais passam por sucessivas mitoses e migram através de movimentos amebóides do saco vitelínico para as gônadas em desenvolvimento (SOTO-SUAZO e ZORN *et al.*, 2005). Após perderem suas características de motilidade e sofrerem extensiva proliferação celular e redistribuição das organelas citoplasmáticas, as células germinativas primordiais se transformam em oogônias (SADEU *et al.*, 2006). As oogônias formadas são envolvidas por um cordão de células somáticas provenientes do mesonéfron e a partir de então sofrem sucessivas mitoses, em seguida entrarão na primeira divisão meiótica (estágio de prófase I) e passarão a ser denominadas oócitos primários (SUH *et al.*, 2002). Os oócitos começam a primeira divisão meiótica, passando pelos estágios da prófase I (leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno) da primeira divisão meiótica (Van den HURK e ZHAO, 2005). No estágio de diplóteno ou vesícula germinativa da prófase I, ocorre a primeira interrupção da divisão meiótica e formação dos oócitos primários, que permanecem neste estágio até a puberdade (SUH *et al.*, 2002). Na puberdade, em razão da liberação pré-ovulatória de LH, a meiose é retomada e o núcleo oocitário entra em diacinese (ADASHI, 1994). Em seguida, ocorre o rompimento da vesícula germinativa, progressão para metáfase I, anáfase I, telófase I, expulsão do primeiro corpúsculo polar e formação do oócito secundário, iniciando a segunda divisão meiótica, em que o núcleo do oócito evolui até o estágio de metáfase II, quando ocorre a segunda interrupção da meiose (GORDON *et al.*, 1994). O oócito permanece assim até ser fecundado pelo espermatozóide, quando então completa a meiose e expulsa o segundo corpúsculo polar, formando o oócito haplóide fecundado (MOORE e PERSAUD, 1994).

## 2.2 FOLICULOGÊNESE

A foliculogênese é o processo de formação, crescimento e maturação folicular, que inicia com a formação dos folículos primordiais e culmina com a ovulação ou morte folicular por atresia (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). O folículo é a unidade fundamental do ovário dos mamíferos, apresentando duas funções importantes: assegurar a nutrição, o crescimento e a maturação do oócito de forma a permitir a ovulação, bem como produzir hormônios como o estrógeno e peptídeos importantes para o seu completo desenvolvimento (CORTVRINDT e SMITZ, 2001; ADASHI, 1994). Eles são constituídos por diferentes tipos celulares (oócito, células da granulosa e da teca) dos quais suas interações são essenciais para a foliculogênese (BONNET *et al.*, 2008). Durante o seu desenvolvimento, o folículo ovariano sofre constantes modificações em sua morfologia, tendo como principais características o crescimento do oócito, a proliferação e a diferenciação das células da granulosa e da teca, bem como o aparecimento da cavidade antral (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006). Diante dessas mudanças morfológicas pode se verificar que a população folicular nos ovários é bastante heterogênea variando entre as espécies (SAUMANDE, 1991). Dessa forma, é possível classificar os folículos ovarianos de acordo com o estágio de desenvolvimento em pré-antrais ou não cavitários (primordiais, primários e secundários), que possuem um oócito circundado por uma ou mais camadas de células somáticas. Já os folículos antrais ou cavitários são caracterizados pela presença de uma área preenchida por fluido folicular, denominada antro, em que, a partir de então, passam a ser classificados como antrais: terciários e pré-ovulatórios. Na fase antral, a maioria dos folículos sofrem atresia, enquanto alguns deles continuam o crescimento e atingem o estágio pré-ovulatório sob um estímulo cíclico de gonadotrofinas, que ocorre após a puberdade (McGEE e HSUEH, 2000).

### 2.2.1 Folículos pré-antrais

Após a colonização dos ovários pelas células germinativas primordiais e posterior diferenciação em oogônias e oócitos, uma camada de células somáticas planas, conhecidas também como células da pré-granulosa, circundam os oócitos formando assim os folículos primordiais (JUENGEL *et al.*, 2002). Estes folículos constituem o pool de reserva folicular, compreendendo cerca de 95% de toda população folicular presente nos ovários dos mamíferos (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Durante a vida reprodutiva das fêmeas, cada folículo primordial tem três possíveis destinos: (I) manter-se quiescente ou em repouso durante todo o período reprodutivo; (II) ser ativado e fazer parte do pool de folículos em crescimento, podendo sofrer

atresia ou ovulação em uma fase posterior do desenvolvimento, ou ainda (III) sair da quiescência e sofrer atresia diretamente (McGEE & HSUEH, 2000; BROEKMANS *et al.*, 2007).

O processo pelo qual o folículo primordial sai do *pool* de reserva e inicia a fase de crescimento é denominada de ativação folicular, caracterizado por diversas mudanças morfológicas que incluem o aumento do diâmetro oocitário, a proliferação das células da granulosa, bem como a mudança de formato destas células de pavimentosas para cúbicas (RUSSE, 1983; EDSON *et al.*, 2009). O controle da ativação de folículos primordiais envolve uma comunicação bidirecional entre o oócito e suas células somáticas circundantes (EPPIG, 2001). Este evento é marcado por um período de crescimento acentuado do oócito, com intensa atividade metabólica. Nesta fase de crescimento, inicia-se o surgimento de uma rede de junções *gap*, que correspondem a canais intercelulares que permitem a passagem de nutrientes, íons inorgânicos, mensageiros secundários e pequenos metabólitos de uma célula para outra. Estes canais são compostos por conexinas, sendo a conexina 43 a mais abundante no ovário uma vez que esta é expressa nas células da granulosa desde o início da foliculogênese (ACKERT *et al.*, 2001). Em contrapartida, a membrana plasmática do oócito apresenta projeções que penetram entre as células da granulosa adjacentes e algumas microvilosidades aparecem na superfície oocitária (LUCCI *et al.*, 2001). O crescimento do oócito depende do suporte de fatores de crescimento e nutrientes secretados pelas células da granulosa. Ao mesmo tempo, os oócitos não são simplesmente receptores passivos, em vez disso, eles têm um papel essencial no controle da proliferação e diferenciação das células da granulosa durante o desenvolvimento dos folículos (SAGA, 2008). Além disso, à medida que os folículos iniciam o crescimento, as proteínas que irão formar a zona pelúcida começam a ser sintetizadas (LEE, 2000).

Os folículos são denominados de primários quando o oócito passa a ser circundado por uma camada completa de células da granulosa de formato cúbico (GOUGEON; BUSSO, 2000). Em fetos de bovinos, o aparecimento de folículos primários, ocorre aos 140 dias de gestação (RUSSE, 1983). Durante o crescimento destes folículos, as células da granulosa se proliferam e há um aumento do oócito em tamanho e conteúdo protéico (PICKTON; BRIGGS; GOSDEN, 1998).

Já os folículos secundários são caracterizados pela presença de duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cúbico ao redor do oócito primário. A presença

destes folículos pode ser observada em fetos bovinos aos 210 dias de gestação, respectivamente (RUSSE, 1983). Nesta fase, o núcleo do oócito começa a assumir uma posição excêntrica e as organelas começam a se mover para a periferia. A zona pelúcida é claramente identificada e o oócito entra em fase de crescimento intensivo aumentando seu volume como resultado do acúmulo de água, íons, carboidratos, proteínas e lipídeos (FAIR *et al.*, 1997). Em seguida, as células da teca, recrutadas a partir do estroma intersticial, formam uma camada em torno das células da granulosa (PETERS, 1979). Essa progressão parece ser controlada por hormônios, peptídeos e fatores de crescimento intraovarianos (FORTUNE, 2003; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

### 2.2.2 Folículos Antrais

Com o crescimento dos folículos secundários e organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre à formação de uma cavidade repleta de líquido denominada antro (DRIANCOURT, 2001). O fluido folicular que preenche esta cavidade contém água, eletrólitos, proteínas séricas e alta concentração de hormônios esteróides secretados pelas células da granulosa (BARNETT *et al.*, 2006), sendo a produção deste fluido intensificada pelo aumento da vascularização folicular e permeabilidade dos vasos sanguíneos, os quais estão fortemente relacionados com o aumento do folículo antral (Van den HURK e ZHAO, 2005). Dentre as várias substâncias presentes no fluido folicular, destacam-se as gonadotrofinas, hormônios esteroides, enzimas, lipoproteínas, bem como fatores de crescimento intraovarianos (WU; TIAN, 2007). Após a formação do antro, os folículos terciários avançados passam a ser dependentes de gonadotrofinas e ainda possuem um oócito primário.

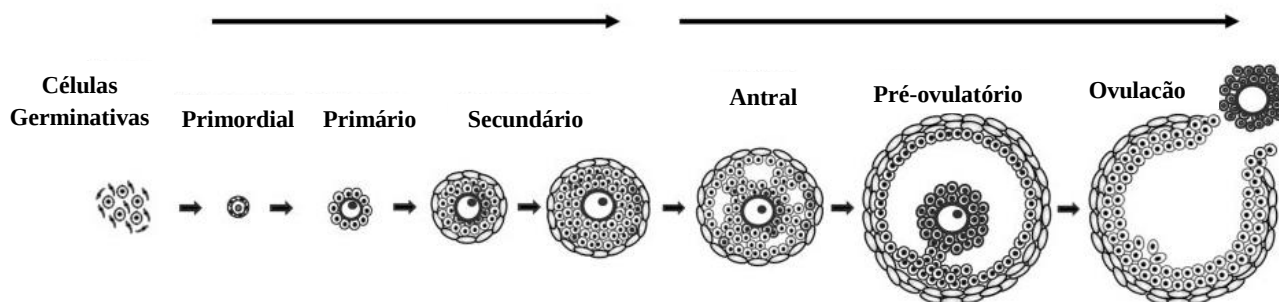


Figura 1. Caracterização morfológica da foliculogênese (adaptado de EDSON *et al.*, 2009)

### 2.3. Recrutamento, seleção e dominância

Os folículos ovarianos passam por fases distintas de crescimento que acontecem em ondas. Esses períodos são denominados recrutamento, seleção, dominância e atresia folicular. DRIANCOURT (2001) define como recrutamento, ou emergência, o crescimento de um grupo de folículos dependentes de gonadotrofinas. Eles são recrutados, quando têm o seu diâmetro em torno de 2-3 mm, sempre após um rápido aumento das concentrações de FSH. A concentração máxima de FSH se dá quando o maior folículo da onda possui diâmetro próximo de 5 mm. Em seguida, essas concentrações de FSH caem para níveis basais (BEG *et al.*, 2002). O desenvolvimento folicular de bovinos é primeiramente coordenado por gonadotrofinas hipofisárias. O hormônio folículo estimulante (FSH) possui um papel chave na regulação da emergência das ondas foliculares e manutenção do crescimento dos folículos durante o período inicial do desenvolvimento. Em cada onda folicular, o período inicial é caracterizado por uma fase de desenvolvimento comum, onde os folículos crescem em diâmetro em resposta ao aumento dos níveis séricos de FSH (ADAMS *et al.*, 1992).

Após o recrutamento, ocorre a fase de seleção ou divergência. Nesse momento, um folículo continua a crescer, tornando-se dominante, enquanto os demais atingem um platô e depois reduzem suas taxas de crescimento, tornando-se subordinados. Em espécies monovulatórias, o período de seleção folicular resulta na diminuição do número de folículos em crescimento até o completo estabelecimento da dominância, onde geralmente é observado o crescimento de somente um folículo. Esta diminuição do número de folículos em crescimento se deve por um aumento na capacidade secretória de estradiol pelos folículos em desenvolvimento e com isso uma regulação na secreção de FSH (PRICE E WEBB, 1988; MIHM *et al.*, 2000). O aumento das concentrações séricas de estradiol diminuem a expressão e a estabilidade do gene que codifica a subunidade beta do FSH (ROCHE, 1996), ocasionando assim uma diminuição dos níveis plasmáticos desse hormônio. A divergência folicular é caracterizada por uma diferença na taxa de crescimento entre o futuro folículo dominante e seus subordinados e ocorre concomitante com a diminuição dos níveis plasmáticos de FSH (GINTHER *et al.*, 1996). O dominante será anovulatório se ocorrer durante a fase em que o corpo lúteo encontra-se ativo secretando altos níveis de progesterona e ovulatório se ocorrer no momento em que os níveis de progesterona estiverem baixos devido a luteólise (GINTHER *et al.*, 1996). Esse fenômeno se dá em bovinos quando o maior folículo apresenta em média 8,5 mm (BEG *et al.*, 2002). O diâmetro máximo dos folículos subordinados varia de 6,2 a 7,1 mm (BORGES *et al.*, 2001). A aquisição de receptores para LH nas células da granulosa é o fator diferencial do folículo

que se tornará dominante em relação aos demais folículos em crescimento (BAO *et al.*, 1997). Outra característica do folículo dominante é a sua alta capacidade de produzir estradiol. No dia cinco do ciclo estral, é muito maior a concentração de estradiol no folículo dominante em relação aos seus subordinados e acredita-se que isso reflita diretamente com o término do aumento na concentração de FSH e na manutenção de níveis basais desse hormônio (FORTUNE *et al.*, 2001). O folículo dominante é o maior responsável pela queda dos níveis de FSH e consegue crescer mesmo sob baixos níveis desse hormônio. Estradiol intrafolicular, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e ativinas parecem estar envolvidos na capacidade do folículo dominante de responder às alterações nas gonadotrofinas (BEG *et al.*, 2002). Quando as concentrações de FSH declinam, os folículos demonstram mudanças em suas características tais como: redução da sua atividade estrogênica, redução nos níveis de inibinas de alto peso molecular e aumento de proteínas ligadoras de IGF (IGFBPs) culminando com a apoptose das células da granulosa. Somente o folículo dominante é capaz de manter a proliferação celular, acumular fluidos foliculares e aumentar sua capacidade esteroidogênica nesse ambiente de queda do FSH circulante (MIHM & BLEACH, 2003).

Após o período de divergência, o folículo dominante passa por um processo de diferenciação, principalmente na camada das células da granulosa. Esse processo é caracterizado por um aumento na capacidade mitótica e esteroidogênica do folículo dominante. Este fato se deve por um aumento na expressão de genes, nas células da granulosa, que codificam receptores para gonadotrofinas (FSHr e LHR) (EVANS & FORTUNE, 1997), enzimas esteroidogênicas chave (aromatase e 3 $\beta$ HSD) (EVANS E FORTUNE, 1997; IRVING-RODGERS *et al.*, 2003) e genes relacionados com o remodelamento da matriz extracelular (Serpine2) (BÉDARD *et al.*, 2003), proliferação celular (cyclina D2; Sicinski *et al.*, 1996) e proteção contra apoptose (XIAP, GADD45b, etc; LI *et al.*, 1998; SHEIKH *et al.*, 2000; DE SMAELE *et al.*, 2001).

A vaca apresenta de duas a três ondas por ciclo estral e raramente pode apresentar uma ou quatro ondas (GINTHER *et al.*, 1989). Para o padrão de duas ondas, a primeira onda começa, em média, no dia zero (dia da ovulação) e a segunda onda começa no dia dez (GINTHER *et al.*, 1989). De cinco a dez folículos são recrutados por onda de crescimento folicular (DRIANCOURT, 2001). Entretanto, um folículo, para crescer, antes de ser selecionado, necessita de FSH. Após essa fase, pulsos de LH são necessários. Os níveis de FSH então caem para níveis basais, durante a seleção folicular. Com uma frequência adequada de pulsos de LH o folículo dominante continua a crescer até que a quantidade de

estradiol seja capaz de induzir a onda ovulatória de LH e, em consequência, a ovulação (WILTBANK *et al.*, 2002). Estudos indicam que folículos menores que 8 mm possuem RNAm para receptores de FSH nas células da granulosa murais e RNAm para receptores de LH somente nas células da teca (XU *et al.*, 1995). Assim, fica claro que a regulação da maturação *in vivo* difere da regulação da maturação *in vitro*, uma vez que folículos pré-ovulatórios (>8mm), com receptores de LH nas células da granulosa respondem não só ao pico de LH, mas também a secreção pulsátil deste, que antecede o pico ovulatório.

Após o completo estabelecimento da dominância folicular, os folículos crescem rapidamente e em poucos dias atingem o diâmetro médio de 10-15 mm nas vacas e, em seguida, ocorre à ovulação do complexo *cumulus*-oócito em resposta ao pico de LH, propiciando a manutenção da fertilidade das fêmeas mamíferas (DRUMMOND, 2006). O folículo pré-ovulatório, na maioria das espécies domésticas, possui um oócito secundário, o qual completará sua meiose após a fusão com o espermatozóide e expulsão do segundo corpúsculo polar (DE LOS REYES *et al.*, 2005).

## 2.4 MATURAÇÃO OOCITÁRIA

A maturação oocitária é a etapa determinante para o sucesso da técnica de produção *in vitro* de embriões (PIV), tendo por objetivo formar uma célula haploide, apta a ser fecundada, e que tenha capacidade para suportar os primeiros estágios de desenvolvimento embrionário, até a ativação do seu genoma. A maturação oocitária envolve duas etapas principais: a maturação nuclear, que se inicia com o rompimento de vesícula germinativa (RVG) e termina apenas quando a meiose é finalizada, marcada pela segregação dos cromossomos e extrusão dos dois corpúsculos polares, e a maturação citoplasmática, que envolve modificações citoesqueléticas e moleculares no oócito (TOSTI, 2006). Apesar de independentes, a maturação nuclear e citoplasmática interagem e, *in vivo*, ocorrem simultaneamente em determinados momentos, garantindo a plena capacitação do oócito (FERREIRA *et al.*, 2008; YAMADA e ISAJI, 2011). Oócitos adquirem competência meiótica durante o estágio de vesícula germinativa (VG) através de uma série de modificações que incluem a síntese protéica, transcrição de RNAm e a reorganização de organelas que conferem ao oócito capacidade para suportar os eventos posteriores ao pico pré-ovulatório de LH, tais como: retomada da meiose, fecundação e embriogênese (BERTAGNOLLI *et al.*, 2004). A não aquisição da competência oocitária nesta fase reflete principalmente no final do

processo, diminuindo a taxa de produção de blastocistos. Em bovinos, a competência oocitária é adquirida durante o crescimento folicular e é diretamente relacionada ao tamanho do oócito e diâmetro folicular, assim à medida que oócitos possuem em torno de 110-120µm, inclusos em folículos a partir de 2-3 mm de diâmetro, são considerados competentes para retomada da meiose (PAVLOK *et al.*, 1992; FAIR *et al.*, 1995; OTOI *et al.*, 1997). Ao final da fase de vesícula germinativa, a atividade transcricional é drasticamente diminuída e o oócito já é capaz de reiniciar a meiose e atingir a MII. *In vivo*, o reinício da divisão meiótica ocorre em resposta ao pico ovulatório de LH somente em oócitos inclusos em folículos pré-ovulatórios completamente diferenciados. No entanto, *in vitro*, esse processo é desencadeado independentemente de hormônios, simplesmente pela remoção do oócito competente do ambiente folicular (PINCUS e ENZMANN, 1935). O reinício da meiose, tanto *in vivo* como *in vitro*, inicia pela dissolução da membrana nuclear e condensação da cromatina no processo denominado de rompimento da vesícula germinativa (RVG), progredindo sucessivamente para os estágios de MI, AI, TI e MII, na qual ocorre o segundo bloqueio da meiose (SIRARD *et al.*, 1989). Durante a retomada da meiose, a cromatina condensa-se evitando a síntese de RNA e, provavelmente, reduzindo o acúmulo de várias moléculas essenciais para o desenvolvimento do embrião (BILODEAU-GOESSELS, 2012). A competência meiótica, ou seja, a habilidade do oócito para reiniciar a maturação nuclear é obtida no final da fase de desenvolvimento. Em bovinos, os oócitos atingem a completa competência meiótica com 110 µm em folículos com diâmetro de 2-3 mm (FAIR *et al.*, 1995). O armazenamento de determinados RNAs e proteínas é realizado durante o crescimento oocitário e é necessário para conferir a competência ao oócito (SIRARD & COENEN, 1994a; BREVINI-GANDOLFI & GANDOLFI, 2001). Ao final desta fase, a atividade de transcrição é drasticamente diminuída e o oócito já é capaz de reiniciar a meiose e atingir a metáfase II. Oócitos incompetentes são deficientes em RNAm para o fator promotor da fase M intracelular (MPF). Os oócitos reiniciam a primeira divisão meiótica depois do estímulo hormonal *in vivo*. Provavelmente, esse é um sinal comum para ativar o MPF e a MAP quinase (MAPK - “mitogen-activate protein”) para a maturação dos oócitos nos mamíferos (DEKEL, 1996).

#### **2.4.1 Maturação nuclear *in vitro***

A maturação nuclear refere-se à progressão da meiose a partir do estágio dictióteno (diplóteno da prófase da primeira meiose - prófase I) até a fase de metáfase II (MINGOTI *et al.*, 1995). O reinício da meiose, tanto *in vivo* como *in vitro*, inicia pela dissolução da membrana nuclear e condensação da cromatina no processo denominado de

rompimento da vesícula germinativa (RVG), progredindo sucessivamente para os estágios de MI, AI, TI e MII, na qual ocorre o segundo bloqueio da meiose (SIRARD *et al.*, 1989). *In vitro*, esse processo é desencadeado independentemente de hormônios, simplesmente pela remoção do oócito competente do ambiente folicular (PINCUS E ENZMANN, 1935). O tempo requerido para a maturação nuclear varia entre as espécies. Em bovinos, o RVG ocorre de 7 – 12 horas, a MI de 12-15 horas, a AI e a TI de 15-18 horas e a MII 18-22 horas após o pico pré-ovulatório de LH ou remoção do oócito do ambiente folicular (SIRARD *et al.*, 1989; WU *et al.*, 1997). Nessa espécie, o reinício da meiose é regulado através de uma complexa cascata de eventos de fosforilação e desfosforilação.

O fator promotor da maturação (MPF) é uma proteína de 79KD responsável pelo início da maturação nuclear do oócito e sua ativação precede ou ocorre concomitantemente com o rompimento da vesícula germinativa (WU *et al.*, 1997; LIU & YANG, 1999). O MPF é um heterodímero composto de uma subunidade catalítica, p34cdc2 kinase (34KD), e uma subunidade reguladora representada pela ciclina B1 (45KD) (GAUTIER *et al.*, 1990; BILODEAU-GOESELS, 2011b). A ativação do MPF ocorre pela desfosforilação da unidade catalítica pela fosfatase cdc25 em treonina 14 e tirosina 15 (KUMAGAI E DUNPHY, 1992) e sua atividade é avaliada pela histona H1 quinase, pela qual MPF possui forte afinidade. Durante o RVG, os níveis de MPF estão baixos, tendo um aumento gradual até atingir níveis máximos no estágio de MI. Após essa fase, o MPF apresenta uma diminuição significativa coincidindo com AI e TI, e um novo aumento é observado em MII, que é mantido por várias horas no oócito, diminuindo gradativamente depois de 30 horas de maturação ou imediatamente após a fecundação e ativação (WU *et al.*, 1997; LIU E YANG, 1999). No entanto, os mecanismos e os fatores implicados na manutenção e inativação do MPF por intervalos prolongados em oócitos, bem como aqueles que conduzem à ativação do MPF e o recomeço da meiose, quer *in vivo*, em resposta ao aumento de gonadotrofina ou espontaneamente *in vitro*, não são totalmente compreendidos em oócitos bovinos e de outras espécies (TRIPATHI *et al.*, 2010).

Outro importante fator envolvido na maturação do oócito é a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK). Em oócitos de mamíferos estão presentes duas isoformas da MAPK conhecidas como quinase regulada extracelular-1 (ERK)-1 (p44) e ERK2 (p42), sendo a última mais abundantemente expressa em oócitos bovinos (TROUNSON *et al.*, 2001). Nessa mesma espécie, a MAPK é ativada na RVG, em consequência da fosforilação de uma tirosina e uma treonina específicas durante a maturação do oócito (KOSAKO *et al.*, 1994) e tem sua atividade máxima em MI permanecendo elevada até a formação dos pronúcleos

(FISSORE *et al.*, 1996), sem diminuir em MII. Durante a maturação do oócito, a atividade da MAPK é essencial para a manutenção do MPF, formação dos fusos meióticos e manutenção do bloqueio meiótico na fase de MII (COLLEDGE *et al.*, 1994; HASHIMOTO *et al.*, 1994). Um estudo recente demonstrou que a PGE2 sintetizado por células do *cumulus* está envolvido na ativação de MAPK, organização normal do fuso e a capacidade de desenvolvimento do oócito (NUTTINCK *et al.*, 2011).

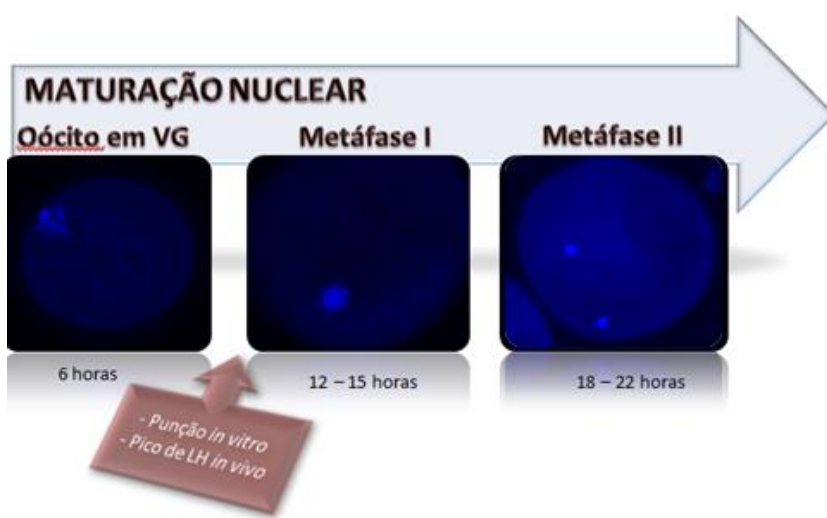


Figura 2. Caracterização da maturação nuclear.

#### 2.4.2 Maturação citoplasmática *in vitro*

Além da maturação nuclear, o processo de obtenção de competência oocitária envolve outra etapa muito importante que é a maturação citoplasmática que se caracteriza pelo remodelamento do citoplasma. Nessa etapa, ocorrem modificações citoesqueléticas e moleculares (TOSTI, 2006), aumento da reserva lipídica, redução do compartimento de Golgi, rearranjo das mitocôndrias (DIELEMAN *et al.*, 2002), redistribuição das organelas e migração de grânulos corticais no interior do oolema (BÉZARD, 1997; DIELEMAN *et al.*, 2002). Apesar de independentes, a maturação nuclear e citoplasmática interage e, *in vivo*, ocorrem simultaneamente em determinados momentos, garantindo a plena capacitação do oócito (FERREIRA *et al.*, 2008; YAMADA E ISAJI, 2011). Alguns trabalhos têm relatado que os oócitos com uma maturação nuclear normal, em tempo regular, mas que possuem uma assincronia entre a maturação citoplasmática e a nuclear, não serão fecundados ou não irão ter um bom desenvolvimento embrionário (BLONDIN & SIRARD, 1995; BEVERS *et al.*, 1997).

A primeira evidência de maturação citoplasmática ocorre quando o oócito interrompe a síntese de RNA e proteínas, por modificações na maquinaria transcricional e traducional (SIRARD *et al.*, 2006). A atividade transcricional é refletida pela ultraestrutura do nucléolo, componente fibrilo-granular, que no período de crescimento oocitário exibe sua maior atividade. Quando o oócito atinge o diâmetro de 110  $\mu\text{m}$ , a função do nucléolo é inativada, refletindo uma mudança ultraestrutural, que é a marginalização dos centros fibrilares. Nesse momento, o nucléolo se torna inativo, sendo ultraestruturalmente observado como uma esfera com fibrilas empacotadas (FAIR *et al.*, 1996). No decorrer do remodelamento do citoplasma, a maioria das organelas migram para o centro da célula. As mitocôndrias e o complexo de Golgi passam a se distribuir mais centralmente na superfície do ooplasma e o complexo de Golgi diminui o seu desenvolvimento simultaneamente com o agrupamento do retículo endoplasmático liso (HYTTEL *et al.*, 1989). O desenvolvimento contínuo da reserva lipídica, provavelmente constitui uma reserva energética para o oócito suportar o desenvolvimento após a fecundação até o estágio de blastocisto (DIELEMAN *et al.*, 2002). Os grânulos corticais que durante o estágio de VG, apresentam-se distribuídos no citoplasma (HOSOE E SHIOYA, 1997), ao final do período de maturação, quando os oócitos atingem o estágio de MII, passam a se distribuir por toda a superfície interna, próximos à membrana plasmática (THIBAUT *et al.*, 1987; WESSEL *et al.*, 2001) sendo importante na prevenção da polispermia, evento conhecido como reação cortical (HOSOE E SHIOYA, 1997). Além disso, ocorre expansão das células do *cumulus*, característica importante na promoção de componentes indispensáveis para o desenvolvimento da competência (KRUIP *et al.*, 1983).

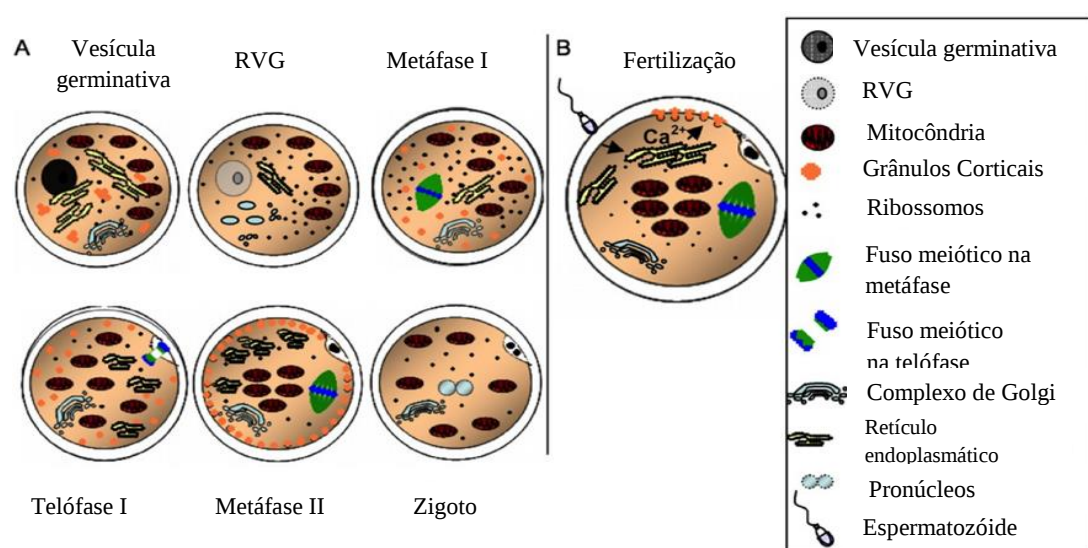


Figura 3. Reorganização das organelas citoplasmáticas durante a maturação citoplasmática (adaptado de FERREIRA *et al.*, 2009)

## 2.5. IMPORTÂNCIA DAS CÉLULAS FOLICULARES PARA A MATURAÇÃO OOCITÁRIA

O folículo ovariano fornece um ambiente inibitório que controla a maturação do oócito e os principais fatores são fornecidos por células do *cumulus*, granulosa mural e da teca (RICHARD & SIRARD, 1996; BILODEAU-GOESEELS, 2011a). O co-cultivo de oócitos e metades foliculares (RICHARD & SIRARD, 1996) tem sido um bom modelo experimental para estudar a interação entre células foliculares e maturação, possibilitando a comunicação entre oócitos, células do *cumulus*, células da granulosa e teca. As metades foliculares, quando dissecadas e cultivadas em condições adequadas, em meios suplementados com gonadotrofinas, mantém a atividade esteroidogênica (KOMAR *et al.*, 2001). A interação entre oócito, células da granulosa e células da teca, através da liberação de fatores autócrinos e parácrinos, determinam o controle do desenvolvimento folicular e da maturação oocitária (EPPIG, 2001). Estes fatos evidenciam que, no folículo, são produzidos fatores inibitórios que impedem a maturação nuclear e, que com o surgimento do LH ovulatório a maquinaria celular do folículo é alterada, cessando a produção de inibidores e estimulado a síntese de fatores promotores da meiose (DOWNS, 2010). A retomada da meiose também é influenciada pelas células foliculares. Esse evento pode ser evidenciado pelo fato dessas células produzirem fatores inibitórios, na qual oócitos são mantidos em VG quando co-cultivados com metades foliculares ou em meio condicionado (SIRARD & FIRST, 1988; RICHARD & SIRARD, 1996; GIOMETTI *et al.*, 2005; BARRETA *et al.*, 2008). Esta ação inibitória tem sido atribuída a várias fontes, incluindo células da granulosa (TSAFRIRI & CHANNING, 1975; SATO *et al.*, 1982; FOOTE & THIBAUT, 1969), componente (s) da parede folicular (LEIBFRIED & FIRST, 1980), e fator lábil (s) da parede folicular (SIRARD & COENEN, 1993). Além disso, KOTSUJI *et al.*, 1994 mostrou que as células da teca influenciam a atividade de células da granulosa no bloqueio meiótico. As células do *cumulus* têm maior expressão de proteínas envolvidas na comunicação celular, a geração de metabólitos precursores e energia (PEDDINT *et al.*, 2010). As células foliculares da teca e da granulosa produzem grandes quantidades de esteróides e diversas proteínas, incluindo os fatores de crescimento. Fatores parácrinos secretados pelas células da granulosa e da teca regulam muitos aspectos importantes do desenvolvimento do oócito. Com isso, uma série de estudos

foram realizados para examinar os efeitos dos componentes estruturais individuais de oócitos de folículos ovarianos na maturação *in vitro*. Células da granulosa bovina mantém oócitos em bloqueio meiótico, com o efeito supressor amplificado pela adição de fluido folicular para o meio de cultura (SIRARD & BILODEAU, 1990; SIRARD *et al.*, 1992). As células da teca tem uma ação de inibição mais profundo sobre a retomada da meiose de oócitos bovinos do que as células da granulosa (RICHARD & SIRARD, 1996), esta ação foi reversível e independente do contato direto entre as células da teca e complexos *cumulus*-oócito (COC) (RICHARD & SIRARD, 1996; RICHARD & SIRARD, 1998). Em suínos, fatores secretados pelas células do *cumulus* melhoram as taxas de extrusão do corpúsculo polar, sobrevivência de oócitos desnudos e a taxa de desenvolvimento de blastocistos.

## **2.6. BLOQUEIO DA RETOMADA DA MEIOSE EM OÓCITOS DE FOLÍCULOS ANTRAIS**

A inibição da retomada da meiose tem sido sugerida como uma estratégia para que os oócitos adquiram um tempo adicional para acúmulo de moléculas necessárias para aquisição de competência e desenvolvimento do embrião (LONERGAN *et al.*, 2000; BILODEAU-GOESSELS, 2012). Assim, esse tempo adicional possibilitaria uma melhor sincronização entre os processos de maturação nuclear e citoplasmática (LE BEAUX *et al.*, 2003). A inibição da meiose pode ser induzida pelo uso de inibidores fisiológicos, tais como a presença de metades foliculares e líquido folicular, ou métodos farmacológicos, como o uso de substâncias que atuam em etapas distintas da via que mantém o Fator Promotor da Meiose (MPF) ativo. Outra abordagem para o bloqueio da MIV com o objetivo de melhorar a capacidade de desenvolvimento é o cultivo em duas etapas, onde, ao invés de usar inibidores farmacológicos durante a etapa inicial, um meio que não promove a maturação nuclear seria usado (OLIVEIRA E SILVA *et al.*, 2011).

O AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) tem uma função inibitória na maturação nuclear de oócitos de muitas espécies. Em bovinos, altos níveis de AMPc no oócito causa um atraso no reinício da meiose, mas não impede a progressão à MII, evento esse correlacionado com a proteína quinase-A (PK-A), a qual é dependente de AMPc (HOMA, 1988; SIRARD, 1990; SIRARD E FIRST, 1988). O AMPc tem sua concentração aumentada em função do estímulo de LH no folículo. Entretanto, níveis altos de AMPc dentro do oócito

impedem o reinício da meiose em diversas espécies (THOMAS *et al.*, 2002). Uma hipótese para explicar isso, propõem que AMPc é compartimentalizado dentro do folículo ovariano, sendo diferentemente regulado dentro do oócito e nas células somáticas (células da teca, granulosa e *cumulus*), devido a diferentes localizações de fosfodiesterases (PDE) (TSAFRIRI *et al.*, 1996). Os níveis de AMPc presentes nas células do *cumulus* e no oócito são dependentes da síntese por adenilatociclase e da degradação por PDE. Em bovinos, a PDE tipo 3 (PDE3) é a principal enzima envolvida na degradação do AMPc no oócito, e a PDE8 está principalmente envolvida com essa degradação nas células do *cumulus* (SASSEVILLE *et al.*, 2009), que também influenciam os níveis de AMPc no interior do oócito, via comunicação intercelular pelas junções tipo gap. O cultivo *in vitro* de complexos *cumulus*-oócito (CCO) bovinos na presença de um inibidor da PDE3 atrasa o reinício da meiose, pela diminuição da degradação e consequente aumento de AMPc (BILODEAU-GOESEELS, 2003). Entretanto, CCOs de camundongo cultivados na presença de um inibidor de PDE3 apresentam o reinício da meiose totalmente bloqueada (ROMERO E SMITZ, 2010).

Dentre os métodos farmacológicos, pode-se citar o uso de substâncias que mantenham altas concentrações de AMPc no interior do oócito, como a cilostamida (BILODEAU-GOESEELS, 2012; ALBUZ *et al.*, 2010; SHU *et al.*, 2008). A inibição da PDE3, especificamente no oócito, pode ser realizada *in vitro* com a utilização de cilostamida (TSAFRIRI *et al.*, 1996). O uso de cilostamida em oócitos de camundongos (NOGUEIRA *et al.*, 2003) reteve 99% em estágio de VG e ainda no mesmo modelo animal, Vanhoutte *et al.*, (2007) mostrou que mais de 80% de oócitos cultivados na presença de cilostamida nas concentrações de 1 e 10  $\mu$ M mantiveram-se em estágio de VG. Em humanos, a retenção meiótica utilizando-se a cilostamida, (inibidor da PDE-3) em combinação com o forskolin, influenciou positivamente a qualidade do oócito observada pelo efeito sinérgico na prevenção da perda das junções gap e na retomada da meiose (SHU *et al.*, 2008).

Dentre os métodos fisiológicos, a utilização das células foliculares e hemi-seções da parede do folículo tenta mimetizar o ambiente folicular durante a maturação *in vitro* (RICHARD & SIRARD, 1996). Em grandes animais, foi observado que a parede folicular promove a inibição meiótica quando os oócitos são cultivados com metades foliculares, com ou sem contato físico (TSAFRIRI & CHANNING, 1975; LEIBFRIED & FIRST, 1980; SIRARD & COENEN, 1993). O fator de inibição produzido pelas células da teca é solúvel no meio e age através das células do *cumulus* (RICHARD & SIRARD, 1996). As células da

granulosa também inibem a maturação nuclear de oócitos bovinos, quando na presença de líquido folicular (GONCALVES *et al.*, 2008). Além disso, oócitos bovinos cultivados em meio condicionado com células foliculares também apresentam inibição da maturação meiótica. A utilização de células foliculares e até mesmo de hemi-seções de folículos no meio de maturação, tenta reconstituir *in vitro* o ambiente folicular com intuito de entender como os mecanismos de retomada da meiose, já que os eventos de maturação espontânea e luteinização das células da granulosa ocorrem com a retirada do oócito do ambiente folicular.

A figura 4 mostra que durante o estágio de vesícula germinativa, GPR3 é ativada no oócito por um ligante não identificado e ativa Gs que estimula adenilato ciclase (AC) a sintetizar AMPc. AMP cíclico, por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA) que ativa a quinase WEE1B para fosforilar CDK1, mantendo o fator promotor da meiose (MPF) inativo. PKA também inativa a fosfatase CDC25B. Durante o reinício da meiose (quebra da vesícula germinativa) é finalizada a transferência de GMPc a partir de células foliculares e fosfodiesterase 3A torna-se ativa. Com o declínio dos níveis de AMPc, PKA é inativada e a fosfatase CDC25B torna-se ativa, desfosforila CDK1 e o MPF é ativado (BILODEAU-GOENSELS, 2012).

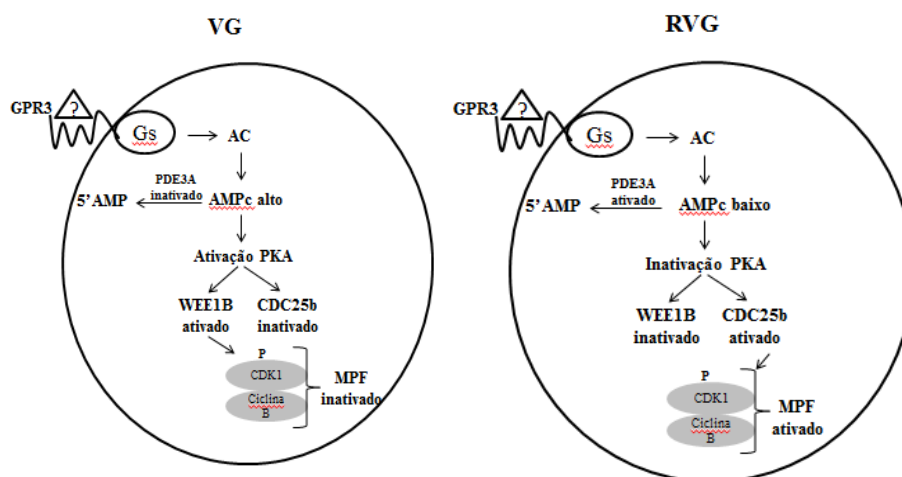


Figura 4. Vias de sinalização envolvidas no controle da maturação (adaptado de BILODEAU-GOENSELS, 2012).

### 3 PROBLEMA E HIPÓTESES

Conforme mostrado na revisão de literatura, a busca por um modelo de bloqueio da retomada espontânea da meiose que seja eficiente é alvo de diversas pesquisas, e a utilização de cilostamida e metades foliculares representa alternativas promissoras. Diante disso, levantou-se a seguinte problemática: (1) Será que a associação de cilostamida e metades foliculares bloqueia a retomada da meiose em 12 horas? (2) Será que a associação de cilostamida e metades foliculares é tóxico ao desenvolvimento oocitário? (3) Será que a presença de cilostamida e metades foliculares mantém o nível de AMPc no CCO, OD e CC? Diante disto, foram formuladas as seguintes hipóteses: (1) Cilostamida e metades foliculares bloqueiam a retomada da meiose por 12 horas; (2) A associação de cilostamida e metades foliculares não é tóxico ao desenvolvimento folicular; (3) A presença de cilostamida e metades foliculares mantem elevado o nível de AMPc no CCO, OD e CC.

#### 4 JUSTIFICATIVA

Atualmente o Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com aproximadamente 200 milhões de animais, e é o líder mundial na produção de embriões. Apesar de anualmente serem produzido mais de 200 mil embriões no Brasil, essa técnica ainda apresenta limitações devido a baixa eficiência na obtenção de oócitos competentes que estejam aptos a alcançarem o estágio de blastocisto (STROUD, 2012). Diversos estudos tem mostrado que apesar de 90% dos oócitos alcançarem o estágio de MII após submeterem-se a maturação *in vitro*, apenas 40% desenvolve-se ao estágio de blastocisto. Desta forma, é de grande importância o desenvolvimento de protocolos que aumentem a eficiência da maturação oocitária e aquisição da competência *in vitro*, sendo a introdução de um período de pré-maturação uma alternativa a ser considerada. A utilização de cilostamida e de metades foliculares durante este período de pré-maturação *in vitro* pode promover bloqueio da retomada da meiose em oócitos derivados de folículos antrais bovinos de 3,0 - 8,0 mm, abrindo novas perspectivas para a avaliação de diversas substâncias que favoreça a aquisição da competência oocitária *in vitro*. Durante o período de bloqueio, ocorre uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas, como: elevação dos níveis de AMPc no complexo *cumulus* oócito, aumento da comunicação entre o oócito e as células do *cumulus*. Estes eventos podem estar associados com um maior tempo para síntese e armazenamento de RNAm, o que proporcionaria uma melhor sincronização entre maturação nuclear e citoplasmática e favoreceria a obtenção de oócitos com maior qualidade oocitária e consequentemente, uma maior taxa de formação de blastocistos. Devido ao interesse crescente em se obter uma exploração maior do potencial genético de fêmeas, a PIV de embriões vem sendo aplicada para o aumento na produção do número de embriões destinados à transferência comercial. Esta técnica é capaz de superar problemas como os de infertilidade adquirida de vacas com alto valor econômico (GALLI *et al.*, 2003) e proporcionar aumento de ganho genético através da multiplicação de bovinos com grande potencial genômico (VISHWANATH, 2003). Além disso, o presente trabalho fornece base para novas pesquisas que tem como objetivo aumentar o número de oócitos que alcancem o estágio de blastocisto, aumentando assim a eficiência da técnica de produção *in vitro* de embriões no Brasil.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVOS GERAIS**

- Avaliar os efeitos da cilostamida e metades foliculares no bloqueio da retomada da meiose por 12 horas.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Definir um modelo de bloqueio da retomada da meiose por 12 horas em CCOs de folículos antrais (3,0 -8,0 mm).
- Realizar o co-cultivo, por 12 horas, da parede de folículos antrais grandes (3,0 – 6,0mm) com CCOs de folículos antrais (3,0 – 8,0 mm) e avaliar o bloqueio da retomada da meiose.
- Avaliar a reversibilidade do tratamento na retomada da meiose em oócitos bovinos.
- Quantificar o nível de AMPc no CCO, OD e CC em bovinos.

## 6 ARTIGO I

***Cilostamide and follicular hemisections inhibit oocyte meiosis resumption and regulate the levels of cAMP in bovine cumulus-oocyte complexes***

*Cilostamide and follicular hemisections inhibit oocyte meiosis resumption and regulate the levels of cAMP in bovine cumulus-oocyte complexes*

F. T. G. Bezerra<sup>a</sup>, A. W. B. Silva<sup>a</sup>, V. B. Rissi<sup>b</sup>, P. A. Rosa<sup>b</sup>, M. P. Cesaro<sup>b</sup>, P. B. D. Gonçalves<sup>b</sup>, J. R.V. Silva<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Biotechnology Nucleus of Sobral - NUBIS, Federal University of Ceara, Sobral, CE, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction – BIOREP, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

\*Corresponding address (J.R.V. Silva): Biotechnology Nucleus of Sobral - NUBIS, Federal University of Ceara, Av. Comandante Maurocélvio Rocha Ponte 100, CEP 62041-040, Sobral, CE, Brazil. Phone / Fax: +55 88 36118000 [jrvsilva@ufc.br]

## **Abstract**

The aims of this study were (1) to evaluate the effects of cilostamide and follicular hemisections on the blockage of in vitro oocyte meiotic resumption in bovine *cumulus* oocyte complexes (COCs), (2) to investigate the reversibility of cilostamide effect on meiotic resumption, and (3) to quantify the levels of cAMP in COCs, denuded oocytes (DO) and *cumulus* cells (CC) after culturing COCs in presence of cilostamide and follicular hemisections. To this end, bovine oocytes were subjected to a pre-maturation period of 12 h in medium containing 10 µM cilostamide, follicular hemisections or combination of both and, then, submitted to in vitro maturation. To evaluate the reversibility of cilostamide effect, at the end of this culture period, COCs were washed and placed in maturation medium without

cilostamide for 12, 14, 16, 18, 20, 22 and 24 hours. To investigate the levels of cAMP, COCs subject to pre-maturation for 6 h were used to measure the levels of cAMP. After 12 hours of culture, groups COCs were fixed to assess chromatin configuration and meiotic progression. The results showed that COCs cultured in presence of cilostamide and follicular hemisections had significantly higher percentages of oocytes at germinal vesicle stage (94%), after a period of 12 h of pre-maturation, than COCs cultured in other treatments. After blocking treatment, 75% of oocytes reached metaphase II after 16 h of maturation, emphasizing that the treatment is not toxic to oocytes. Moreover, oocytes cultured in medium containing cilostamide and follicular hemisections had significantly higher levels of cAMP when compared to other treatments. It is concluded that cilostamide and follicular hemisections interact and promotes the maintenance of oocytes at germinal vesicle stage by increasing the levels cAMP in cultured COCs.

**Key-words:** oocyte, bovine, cilostamide, maturation, cAMP

### **Introduction:**

In most mammalian species, the follicle-enclosed oocyte is arrested at the diplotene stage of the first meiotic prophase. In cattle, oocytes develop competence to undergo germinal vesicle break down (GVBD) when the follicle reaches 2-3 mm in diameter (ARLOTTO *et al.*, 1996; LEQUARRE *et al.*, 2005). The oocytes undergo meiotic resumption after the preovulatory LH surge *in vivo* or, spontaneously, after oocyte removal from the follicular environment *in vitro* (SIRARD *et al.*, 1989; WU *et al.*, 1997). Only competent oocytes are able to reassume and complete meiosis *in vitro*, and this competence is progressively acquired during their growth phase (CROZET *et al.*, 1998). The process of oocyte maturation is a complex orchestration of molecular, cytoplasmic, and nuclear events that must occur in a synchronized manner (VANHOUTTE *et al.*, 2008). RNA, protein and nutrition stockpiles are

accumulated in the oocyte before ovulation and expected to support embryo development through several cleavages prior to major embryo genome activation (TELFORD *et al.*, 1990).

Inhibition or delay of spontaneous nuclear maturation *in vitro* would allow more time for some of the oocytes to accumulate more of the molecules that are important for early development and therefore, would potentially improve the efficiency of *in vitro* embryo production (BILODEAU-GOESSELS, 2012). Spontaneous resumption of meiosis is mainly due to a decrease in the concentration of intraoocyte cAMP, which has a major role in controlling mammalian oocyte maturation (THOMAS *et al.*, 2002; LUCIANO *et al.*, 2004). The temporary blockage of oocyte meiotic resumption *in vitro* can be performed by modulating intra-oocyte cyclic adenosine monophosphate (cAMP) content with different agents, such as cAMP analogues or phosphodiesterase (PDE) inhibitors (LUCIANO *et al.*, 2004; LOODE *et al.*, 2013; LUCIANO *et al.*, 2011; VANHOUTTE *et al.*, 2008; GUIXUE *et al.*, 2001; GRUPEN and ARMSTRONG, 2006). Inhibition of the oocyte-specific phosphodiesterase 3 (PDE3), a enzyme that degrades cAMP, keeps intra-oocyte cAMP levels elevated and maintains the oocyte arrested at the GV stage. Inhibition of PDE3 in oocytes has been performed *in vitro* using cilostamide (TSAFRIRI *et al.*, 1996) in different species (human: SHU *et al.*, 2008; VANHOUTTE *et al.*, 2008; VANHOUTTE *et al.*, 2009, bovine: LUCIANO *et al.*, 2011; ALBUZ *et al.*, 2010, ovine: ROSE *et al.*, 2013 and murine: NOGUEIRA *et al.*, 2013; VANHOUTTE *et al.*, 2008; ALBUZ *et al.*, 2010; JEE *et al.*, 2009) and its efficiency depends on species, time of COC incubation and the combination with other agents. *In vitro* studies have also shown that co-culturing COCs and follicular hemisections inhibits meiotic oocyte resumption, at least temporarily (Richard and Sirard 1996), indicating that follicular cells produce factors that inhibit meiotic progression. Follicular walls, which include granulosa and theca cells, produce large amounts of steroids and various proteins, including growth factors. Paracrine factors secreted by granulosa and

theca cells regulate many important aspects during oocyte development. Therefore, SIRARD and BILODEAU (1990) demonstrated that ovine granulosa cells maintained bovine oocytes in meiotic arrest. However, it is not known if there is a synergistic effect between follicular hemisections and cilostamide on the blockage of oocyte meiosis in bovine species.

The aim of this study was to evaluate the effects of follicular hemisections and cilostamide on resumption of meiosis in bovine oocytes, as well as on the levels of cAMP in *cumulus* oocyte complex (COC), *cumulus*-cells (CC) and desnuded oocyte (DO).

## **Materials and Methods:**

All chemicals used were purchased from Sigma Chemicals Company, St. Louis, MO, USA, unless otherwise indicated in the text.

### **Experiment I: Influence of follicular hemisections and cilostamide on meiotic resumption**

Cow ovaries were obtained from a local abattoir and transported to the laboratory in saline solution (0,9% NaCl; 30°C) containing 100 IU/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin sulfate. *Cumulus* oocyte complexes (COCs) from follicles (3 to 8 mm in diameter) were aspirated with a vacuum pump. The COCs were recovered and selected according to Leibfried and First (1980), under a stereomicroscope. Grade 1 and 2 COCs were randomly distributed into 200 µl of maturation medium and cultured in an incubator at 39°C in a saturated humidity atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> and 95% air.

To obtain follicular hemisections, follicles were isolated from the ovaries and dissected free of stromal tissue (RICHARD & SIRARD, 1996) and transparent follicles measuring 3–6 mm in diameter were selected. The follicles were sectioned into equal halves with a scalpel and the oocytes were removed and discarded. Then, the follicular hemisections

were washed in TCM 199 containing 0.4% BSA and culture for 2 h before incubation with COCs.

The maturation control medium used was TCM 199 containing Earle's salts and L-glutamine (GibcoLabs, Grand Island, NY, USA) supplemented with 25 mM HEPES, 0.2 mM pyruvic acid, 2.2 mg/ml sodium bicarbonate, 5.0 µg/ml LH (Bioniche, Belleville, ON, Canada), 0.5 µg/ml FSH (Bioniche, Belleville, ON, Canada), 0.4% bovine serum albumin (BSA), 100 IU/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin sulphate (TCM 199\*). To evaluate the effects of follicular hemisections and cilostamide on meiosis resumption, COCs (n=194) were subject to pre-IVM in the following treatments: (I) TCM-199\*; (II) TCM-199\* supplemented with 10µM cilostamide; (III) TCM-199\* in presence of follicular hemisections and (IV) TCM-199\* supplemented with 10µM cilostamide in presence of follicular hemisections, for 12 hours. After culture, to evaluate chromatin configuration and meiotic progression, the *cumulus* cells were removed by vortexing and the oocytes were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and transferred to 0.5% Triton X-100. Changes in chromatin configuration were assessed by 10 µg/ml bisbenzimidazole (Hoechst 33342) and analyzed under an epifluorescent inverted microscope (Leica, DMI4000B). Oocytes were classified according to the nuclear maturation stage as germinal vesicle (GV), GVBD, metaphase I (MI), anaphase I (AI), telophase I (TI), and metaphase II (MII).

Statistical analysis software (SAS; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) was used to conduct analysis and each COC was considered as an experimental unit. The percentages of GVBD in the different treatments were evaluated using a statistical model for categorical data (PROC CATMOD), and the differences between groups were compared by means of contrasts. The differences were considered significant when  $p < 0.05$ . Data are presented as mean  $\pm$  SEM. All *in vitro* experiments were performed in triplicate.

### **Experiment II: Assessment of reversibility of meiotic inhibition treatment**

This experiment was conducted to evaluate whether induced blockage of meiosis resumption is reversible. To this end, ovaries from cows were collected in a local abattoir and COCs (n = 540) were cultured in IVM medium (TCM-199\*) supplemented with 10  $\mu$ M cilostamide and follicular hemisections for 12 hours. At the end of this culture period, COCs were washed and placed in maturation medium (TCM-199\*) without cilostamide for 12, 14, 16, 18, 20, 22 and 24 hours. Assessment of chromatin configuration and meiotic progression was performed. At the end of culture period, the percentages of MII at different times were analyzed by frequency by Chi-square, and the results are expressed in percentages. The differences were considered significant when  $p < 0.05$ . Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

### **Experiment III: Influence of follicular hemisections and cilostamide on cAMP levels**

Ovaries from cows were collected in a local abattoir and COCs (n=240) and subject to pre-IVM for 6 and 12 hours in the following treatments: (I) TCM-199\*, (II) TCM-199\* supplemented with 10 $\mu$ M cilostamide, (III) TCM-199\* in presence of follicular hemisections and (IV) TCM-199\* supplemented with 10 $\mu$ M cilostamide in presence of follicular hemisections. After 6 hours, groups of 50 – 60 COCs were used to measure the levels of cAMP. After 12 hours of culture, groups COCs were fixed to assess chromatin configuration and meiotic progression. To evaluate the levels of cAMP, COCs were dissociated by vortexing in TCM 199 containing Earle's salts and L-glutamine (GibcoLabs, Grand Island, NY, USA containing 1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (Sigma) to obtain both the *cumulus* cells and the associated oocytes. IBMX, a non-selective phosphodiesterase (PDE) inhibitor, was used to inhibit endogenous PDE activities during preparation of the assay. After three washes in phosphate-buffered saline, samples were

solubilized in 200 µl of 0,1 M HCl on ice for 10 min, then snapped frozen in liquid nitrogen, and stored at -80° C until assay. For enzyme immunoassay (EIA) measurement of cAMP levels, samples were acetylated and levels of cAMP in the reconstituted samples were quantified using a cAMP EIA kit (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's instructions.

The results of the measurement of cAMP levels were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and multi-comparison between hours was performed by least square means. Data were tested for normal distribution using the Shapiro–Wilk test and normalized when necessary. The differences were considered significant when  $p < 0.05$ . Data are presented as mean  $\pm$  SEM. All *in vitro* experiments were performed in triplicate.

## **Results:**

### **Experiment I: Influence of follicular hemisections and cilostamide on meiotic resumption**

After 12 hours of culturing COCs in presence of cilostamide, follicular hemisections or both, a significant increase of GV oocytes was observed when compared to control group. Additionally, significantly higher percentages of oocytes in GV from COCs cultured in presence of both cilostamide and follicular hemisections was observed when compared to COCs cultured in presence of either cilostamide or follicular hemisections (fig. 1), emphasizing a synergistic effect of these compounds.

### **Experiment II: Assessment of reversibility of meiotic inhibition treatment**

Following blockage of meiotic resumption, 75.5% of the oocytes reached the MII stage after 16 h of IVM (Fig. 2,  $P < 0.05$ ). This percentage was not significantly different from those observed after 18 (78,1%), 20 (85,2%), 22 (85,7%) and 24 (94,7 %) h of IVM..

### **Experiment III: Influence of follicular hemisections and cilostamide on cAMP levels**

COCs cultured in presence of 10  $\mu$ M cilostamide and follicular hemisections had significantly higher levels of cAMP when compared to COCs cultured in other treatments. Furthermore, COCs cultured in medium with either cilostamide or follicular hemisections had levels of cAMP similar to control group (fig. 3A,  $P < 0.05$ ). Concerning the *cumulus* cells, a significant increase in levels of cAMP in COCs cultured in medium with both cilostamide and follicular hemisections were observed when compared to other treatments. Furthermore, COCs cultured in medium with either cilostamide or follicular hemisections had levels of cAMP similar to control group (fig. 3B) ( $P < 0.05$ ). No significant differences in the level of cAMP from denuded oocytes cultured in the different treatments were observed (fig. 3C) ( $P < 0.05$ ).

### **Discussion:**

This study shows for the first time a synergistic effect of cilostamide and follicular hemisections in the maintenance of the GV stage in bovine oocytes cultured *in vitro* for 12 hours. Previous studies have suggested that inhibition or delay of spontaneous nuclear maturation *in vitro* would allow more time for some of the oocytes to accumulate more of the molecules that are important for early development and therefore, which would potentially improve the efficiency of *in vitro* embryo production (BILODEAU-GOESSELS, 2012). In our study, the synergistic action of cilostamide and follicular hemisections kept 94.44% of oocytes in GV during pre-IVM culturing. The co-culture of oocytes and follicular hemisections efficiently inhibits oocyte meiotic resumption, probably because during the culture period, cells from 3 to 8 mm follicles produce inhibitory factors (SIQUEIRA *et al.*, 2012) that associated with cilostamide acts as a specific inhibitors of the oocyte-specific PDE (CONTI *et al.*, 2002; SASSEVILLE *et al.*, 2009) holding meiosis block. Cilostamide acts as a specific inhibitor of the oocyte-specific PDE3, an enzyme-degrading cAMP (RICHARD *et al.*, 2001; SASSEVILLE *et al.*, 2009). PDE3 inhibitors have been examined in experimental

IVM systems, using a biphasic IVM approach (NOGUEIRA *et al.*, 2003a,b; NOGUEIRA *et al.*, 2006; SHU *et al.*, 2008; VANHOUTTE *et al.*, 2009a, b). In mouse, 1  $\mu$ M cilostamide kept 90% of oocytes in GV (VANHOUTTE *et al.*, 2008), but in bovine species, treatment of COCs with 50  $\mu$ M cilostamide maintained 20% of oocytes at GV stage after 16 hours of culturing (THOMAS *et al.*, 2002). In our study, treatment with 10  $\mu$ M cilostamide retained about 36% of oocytes in GV, which is similar to results described by Mayes and Sirard (2002), in which 30.4% of oocytes were retained at the GV stage. The somatic components of the follicle also have been implicated in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes (DE LOOS *et al.*, 1994; RICHARD and SIRARD, 1996). Maturing oocytes interact with surrounding somatic cells, which produce various paracrine factors that regulate oocyte development (VAN DER HURK and ZHAO, 2005). RICHARD and SIRARD (1996a) showed that COCs co-cultured for 24 hours with follicular hemisections had 57% of oocytes in VG. This results is similar to those described in our study, i.e., 49% of oocytes were in GV stage after 12 hours of culture. Some studies have proposed that the inhibitory factor(s) are originated from granulosa cells (SIRARD and BILODEAU, 1990a; SIRARD and BILODEAU, 1990b). However, other experiments described that isolated theca cells also secrete inhibitory factors capable of maintaining *cumulus*-oocyte complexes (COCs) in meiotic arrest (RICHARD and SIRARD, 1996a; RICHARD and SIRARD, 1996b).

Our results showed that blocking meiotic progression of oocytes with cilostamide and follicular hemisections is a reversibly process, since after block with cilostamide and follicular hemisections, high percentages of oocytes (up to to 91%) cultured in maturation medium for 16 hours reached MII, indicating that treatment is not toxic to oocyte. In addition, other studies had already demonstrated a reversible effect of this inhibitor in mouse (Nogueira *et al.*, 2005), human (Shu *et al.*, 2008) and Pig (Dieci *et al.*, 2013).

In this study, the cAMP levels remained elevated in COCs and *cumulus* cells treated with cilostamide and follicular hemisections for 12 hours. Several mechanisms control intraoocyte cAMP level. cAMP is synthesized in the oocyte by constitutively active G protein-coupled receptor type 3 (GPR3) (MEHLMANN *et al.*, 2002), and it is supplied to the oocyte by neighboring *cumulus* cells through the gap junctions (ANDERSON and ALBERTINI, 1976; WEBB *et al.*, 2002). Intraoocyte cAMP content is also sustained by somatic cells that supply cGMP to the oocyte (TORNELL *et al.*, 1991), which inhibits the oocyte-specific PDE3 activity. High levels of oocyte cAMP are known to maintain the oocyte in meiotic arrest (TSAFRIRI *et al.*, 1996) by activating protein kinase A, which in turn suppresses the activity of maturation-promoting factor (for review, see (DOWNS, 2010). Besides these well-characterized mechanisms of action by cAMP, the present results may suggest that cAMP could be involved in the control of the activity of factors that modulate transcription and large-scale chromatin remodeling during the final phase of oocyte growth and before the resumption of meiosis (LUCIANO *et al.*, 2011).

**In conclusion,** 10  $\mu$ M cilostamide and follicular hemisections interacts and are effective to prevent oocyte meiotic resumption and to maintain a high levels of cAMP in in bovine CCOs cultured for 12 hours.

### **Conflict of interest statement**

There was no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

### **Acknowledgments**

This research was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil, grant number **552376/2011-6**) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, grant number 23038.007469/2011-17). Francisco Taiã Gomes Bezerra is a recipient of a grant from CAPES.

## References

- ALBUZ, F. K.; SASSEVILLE, M.; LANE, M.; ARMSTRONG, D. T.; THOMPSON, J. G. GILCHRIST, R. B. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction**, v. 25, p. 2999-3011, 2010.
- ANDERSON, E.; ALBERTINI, D. F. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. **The Journal of Cell Biology**, v. 71, p. 680–686, 1976.
- ARLOTTO T, SCHWARTZ JL, FIRST NL, LEIBFRIED-RUTLEDGE ML, (1996). Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, 45: 943-956.
- BILODEAU-GOESEELS, S. Bovine Oocyte Meiotic Inhibition Before In Vitro Maturation and Its Value to *In Vitro* Embryo Production: Does it Improve Developmental Competence? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 687–693, 2012.
- CONTI, M.; ANDERSEN, C. B.; RICHARD, F.; MEHATS, C.; CHUN, S. Y.; HORNER, K.; JIN, C.; TSAFRIRI, A. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Mol Cell Endocrinology**, v. 187, p. 153–159, 2002.
- CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; GALL, L. Meiotic competence of growing oocytes from adult goats. In: Lauria, A., Gandolfi, F., Enne, G., Gianaroli, L. (Eds.), *Gametes: Development and Function*, Sero Symposium, p. 195–202, 1998.
- DE LOOS, F. A.; ZEINSTRA, E.; BEVERS, M. M. Follicular wall maintains meiotic arrest in bovine oocytes cultured *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 39, p. 162–165, 1994.
- DIECI, C.; LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; LAGUTINA, I.; ESSARO, I.; MODINA, S.; ALBERTINI, D. F.; LAZZARI, G.; GALLI, C.; LUCIANO, A. M. The Effect of Cilostamide on Gap Junction Communication Dynamics, Chromatin Remodeling, and Competence Acquisition in Pig Oocytes Following Parthenogenetic Activation and Nuclear Transfer. **Biology of Reproduction**, v. 89, p. 1–11, 2013.
- DOWNS, S. M. Regulation of the G2/M transition in rodent oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, p. 566–585, 2010.

GRUPEN, C. G.; FUNG, M.; ARMSTRONG, D. T. Effects of milrinone and butyrolactone-I on porcine oocyte meiotic progression and developmental competence. **Reproduction Fertility and Development**, v. 18, p. 309-317, 2006.

GUIXUE, Z.; LUCIANO, A. M.; COENEN, K.; GANDOLFI, F.; SIRARD, M. A. The influence of cAMP before or during bovine oocyte maturation on embryonic developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1733-1743, 2001.

JEE, B. C.; CHEN, H. Y.; CHIAN, R. C. Effect of a phosphodiesterase type 3 inhibitor in oocyte maturation medium on subsequent mouse embryo development. **Fertility and Sterility**, v. 91, p. 2037-2042, 2009.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Follicular control of meiosis in the porcine oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 23, p. 705-709, 1980.

LEQUARRE AS, VIGNERON C, RIBAUCCOUR F, HOLM P, DONNAY I, DALBIES-TRAN R, CALLESEN H & MERMILLOD P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology**, 63 841–859, 2005.

LODDE ,V.; FRANCIOSI, F.; TESSARO, I.; MODINA, S. C.; LUCIANO, A. M.. Role of gap junction-mediated communications in regulating large-scale chromatin configuration remodeling and embryonic developmental competence acquisition in fully grown bovine oocyte. **J Assist Reprod Genet**, v. 30, p.1219–1226, 2013.

LUCIANO, A. M.; FRANCIOSI, F.; MODINA, S. C.; LODDE, V. Gap Junction-Mediated Communications Regulate Chromatin Remodeling During Bovine Oocyte Growth and Differentiation Through cAMP-Dependent Mechanism(s). **Biology of Reproduction**, v. 85, p. 1252-1259, 2011.

LUCIANO, A. M.; MODINA, S.; VASSENNA, R.; MILANESI, E.; LAURIA, A.; GANDOLFI, F. Role of intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during *in vitro* maturation of bovine oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 465-472, 2004.

MAYES, M. A.; SIRARD, M. A. Effect of Type 3 and Type 4 Phosphodiesterase Inhibitors on the Maintenance of Bovine Oocytes in Meiotic Arrest. **Biology of Reproduction**, v. 66, 180-184, 2002.

MEHLMANN, L. M.; JONES, T. L.; JAFFE, L. A. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. **Science**, v. 297, p. 1343–1345, 2002.

NOGUEIRA D, CORTVRINDT R, DE MATOS DG, VANHOUTTE L, SMITZ J. Effect of phosphodiesterase type 3 inhibitor on developmental competence of immature mouse oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 2045-2052, 2003.

NOGUEIRA D, CORTVRINDT R, EVERAERDT B, SMITZ J. Effects of long-term *in vitro* exposure to phosphodiesterase type-3 inhibitors on follicle and oocyte development. **Reproduction**, v.130, p.177-186, 2005.

NOGUEIRA, D.; CORTVRINDT, R.; DE MATOS, D. G.; VANHOUTTE, L.; SMITZ, J. Effect of phosphodiesterase type 3 inhibitor on developmental competence of immature mouse oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 2045-2052, 2003b.

NOGUEIRA, D.; RON-EL, R.; FRIEDLER, S.; SCHACHTER, M.; RAZIEL, A.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. Meiotic arrest *in vitro* by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 177–184, 2006.

RICHARD, F. J.; SIRARD, M. A. Effect of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 22–28, 1996.

RICHARD, F. J.; SIRARD, M. A. Effect of follicular cells on oocyte maturation. I: Effects of follicular hemisections on bovine oocyte maturation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 16–21, 1996a.

RICHARD, F. J.; SIRARD, M. A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 22–28, 1996b.

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

ROSE, R. D.; GILCHRIST, R. B.; KELLY, J. M.; THOMPSON, J. G.; SUTTON-McDOWALL, M. L. Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators. **Theriogenology**, v. 79, p. 142-148, 2013.

SASSEVILLE, M.; GAGNON, M. C.; GUILLEMETTE, C.; SULLIVAN, R.; GILCHRIST, R. B.; RICHARD, F. J. Regulation of gap junctions in porcine *cumulus*-oocyte complexes: contributions of granulosa cell contact, gonadotropins, and lipid rafts. **Molecular Endocrinology**, v. 23, p. 700–710, 2009.

SHU, Y. M.; ZENG, H. T.; REN, Z.; ZHUANG, G. L.; LIANG, X. Y.; SHEN, H. W.; YAO, S. Z.; KE, P. Q.; WANG, N. N. Effects of cilostamide and forskolin on the meiotic resumption and embryonic development of immature human oocytes. **Human Reproduction**, v. 23, p. 504-513, 2008.

SIQUEIRA, L.C.; BARRETA, M.H.; GASPERINA, B.; BOHRERA, R.; SANTOS, J.T.; JUNIOR, J.B.; OLIVEIRA, J.F.; GONÇALVES, P.B. Angiotensin II, progesterone, and prostaglandins are sequential steps in the pathway to bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v.77, p. 1779–1787, 2012.

SIRARD, M. A. Temporary inhibition of *in vitro* meiotic resumption *in vitro* by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 33, p. 757-767, 1990.

SIRARD, M. A.; BILODEAU, S. Effect of granulosa cell co-culture on invitro meiotic resumption of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 89, p. 459–465. 1990a;

SIRARD, M. A.; BILODEAU, S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 777–783, 1990b.

SIRARD, M. A.; FLORMAN, H. M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; BARNES, F. L.; SIMS, M. L.; FIRST, N. L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 6, p. 1257-63, 1989.

TELFORD N, WATSON A, SCHULTZ G. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. **Mol Reprod Dev**, v. 26, v. 90-100, 1990.

THOMAS, R. E.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. **Developmental Biology**, v. 244, n. 2, p. 215-25, 2002.

TORNELL, J.; BILLIG.,H.; HILLENSJO, T. Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides. **Human Reproduction**, v. 6, p. 411– 422, 1991.

TSAFRIRI, A.; CHUN, S. Y.; ZHANG, R.; HSUEH, A. J.; CONTI, M. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of Camp levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. **Developmental Biology**, v. 178, n. 2, p. 393-402, 1996.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717–1751. 2005.

VANHOUTTE L, NOGUEIRA D, GERRIS J, DHONT M, DE SUTTER P. Effect of temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor on morphological and functional aspects of *in vitro* matured mouse oocytes. **Mol Reprod Dev** 2008; 75:1021-1030.

VANHOUTTE, L.; NOGUEIRA, D.; DE SUTTER, P. Prematuration of human denuded oocytes in a three-dimensional co-culture system: effects on meiosis progression and developmental competence. **Human of Reproduction**, v. 24, p. 658–669, 2009a.

VANHOUTTE, L.; NOGUEIRA, D.; DUMORTIER, F.; DE SUTTER, P. Assessment of a new *in vitro* maturation system for mouse and human cumulus-enclosed oocytes: three-dimensional prematuration culture in the presence of a phosphodiesterase 3-inhibitor. **Human of Reproduction**, v. 24, p. 1946-1959, 2009b.

VANHOUTTE, L.; NOGUEIRA, D.; GERRIS, J.; DHONT, M.; DE SUTTER, P. Effect of temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor on morphological and functional aspects of *in vitro* matured mouse oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 1021-1030, 2008.

WEBB, R. J.; MARSHALL, F.; SWANN, K.; CARROLL, J. Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in [cAMP] and protein kinase a in mammalian oocytes. **Developmental Biology**, v. 246, p. 441–454, 2002.

WU, B.; IGNOTZ, G.; CURRIE, W. B.; YANG, X. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 1, p. 253-9, 1997.

### Figure legends

Figure 1. Percentage of oocytes at the germinal vesicle stage (G.V) after 12 h of culture in TCM-199 alone or supplemented with 10µM cilostamide, or follicular hemisections, and in TCM-199 supplemented with 10µM cilostamide in presence of follicular hemisections. Different lower case letters (a / b / c) represent significant differences among treatments ( $p < 0.05$ ).

Figure 2. Percentages of oocytes that had meiotic arrested by culturing in TCM-199 supplemented with 10µM cilostamide in presence of follicular hemisections and that reached MII stage after 12, 14, 16, 18, 20, 22 and 24 hours of *in vitro* maturation. Different lower case letters (A / B) represent significant differences between time ( $p < 0.05$ ).

Fig. 3. Levels of cAMP in bovine oocytes culture for 6 hours in TCM-199; TCM-199 supplemented with 10µM cilostamide; TCM-199\* in presence of follicular hemisections and TCM-199\* supplemented with 10µM cilostamide in presence of follicular hemisections. (A) oocyte cumulus complex (CCO); (B) cumulus cell (CC); (C) desnuded oocytes (OD). Distinct upper case letters (A/B) represent significant differences between treatments ( $P < 0.05$ ).

Figure 1

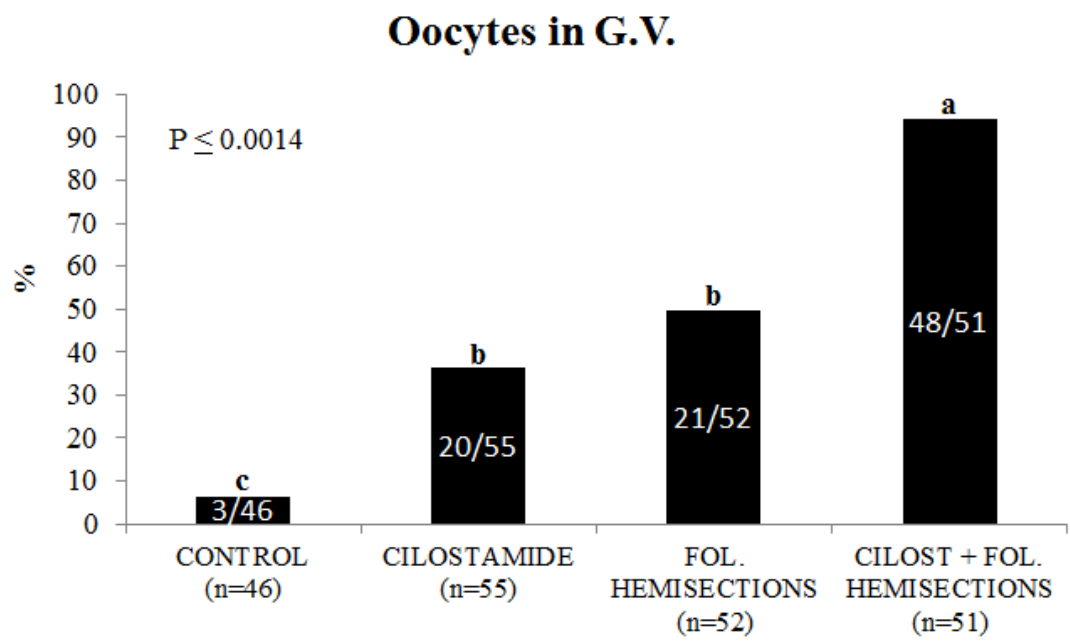


Figure 2

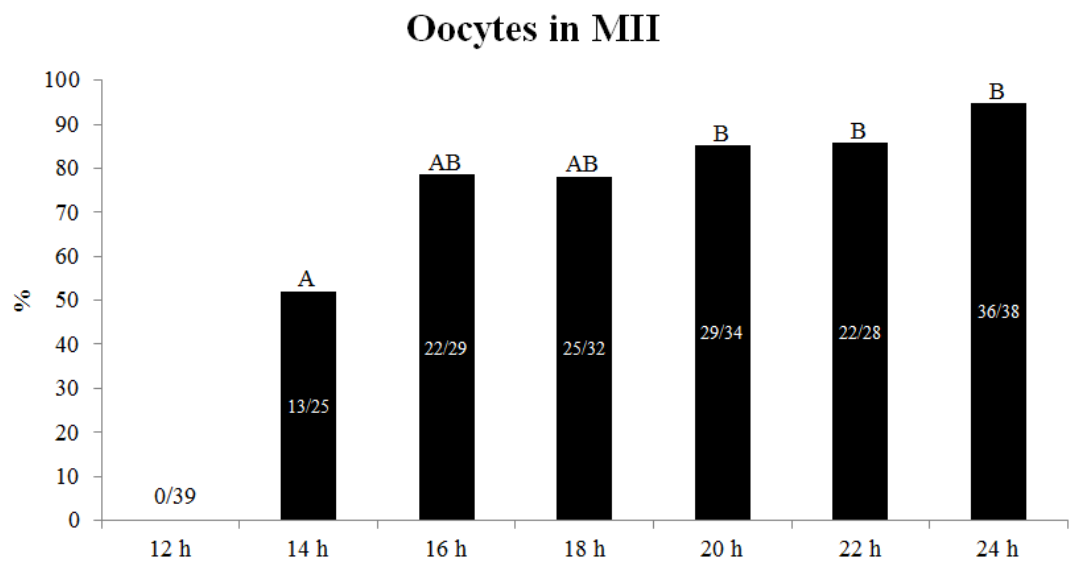
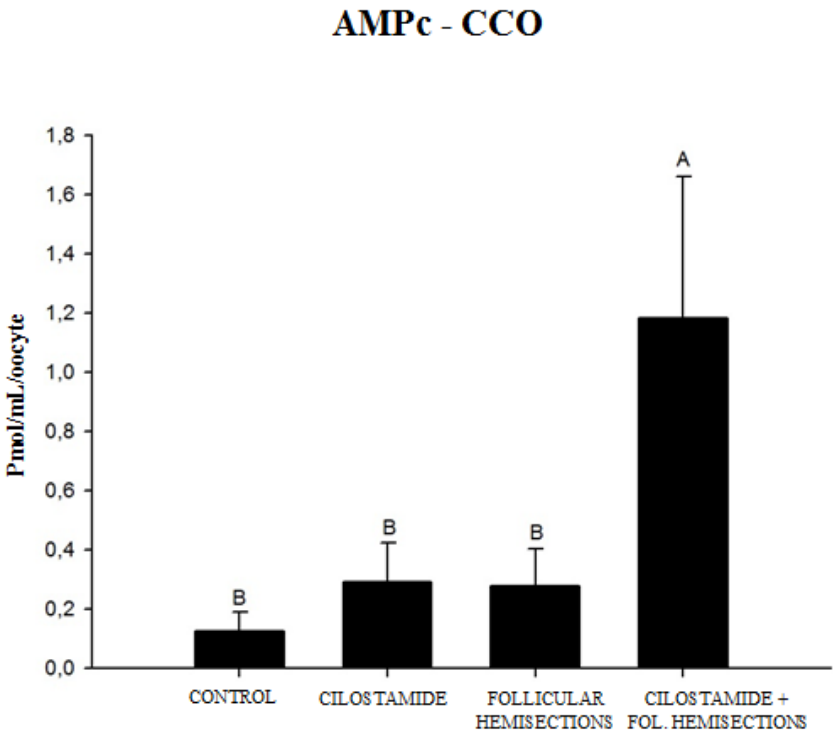
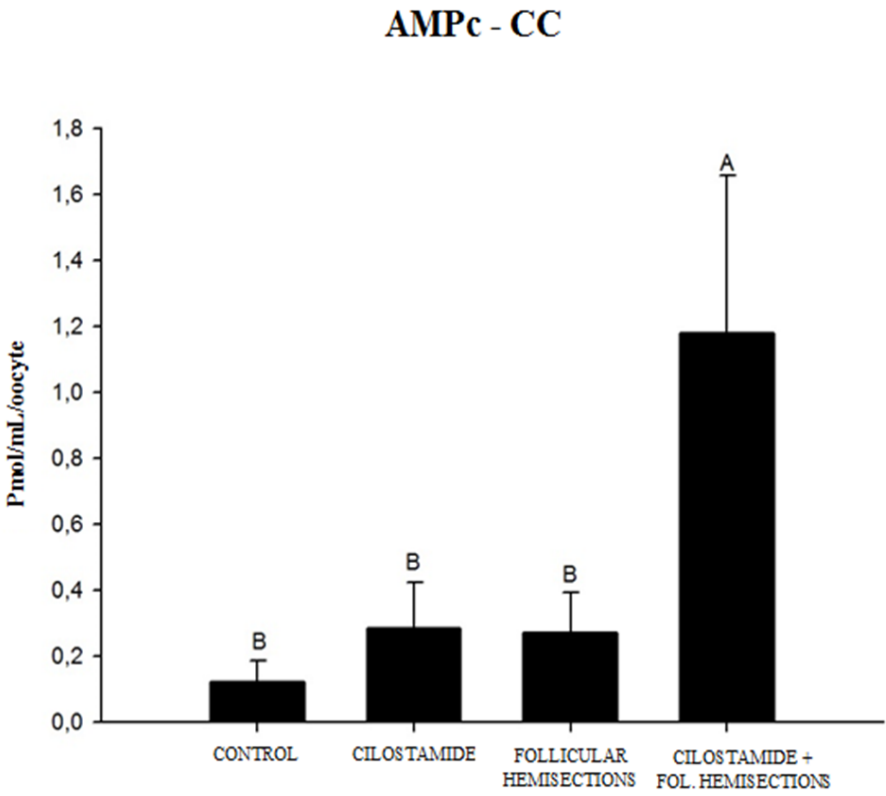


Figure 3

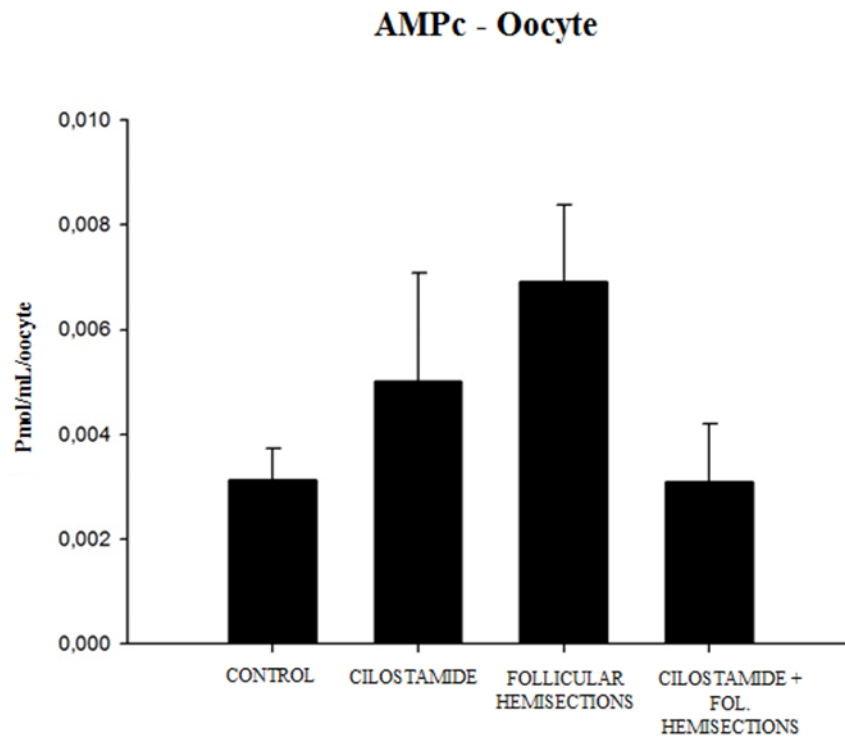
(A)



(B)



(C)



## 7. CONCLUSÕES GERAIS

- A associação de cilostamida e metades foliculares bloqueia a retomada da meiose em oócitos de folículos antrais bovinos por 12 horas.

- O bloqueio da retomada da meiose induzido pela associação de cilostamida e metades foliculares é reversível, possibilitando a obtenção de taxas significativas de oócitos em MII após 12 horas de bloqueio, seguido por 16 horas de maturação *in vitro*.

- O nível de AMPc é significativamente elevado nos CCOs cultivados em meio contendo cilostamida e metades foliculares por 6 horas.

## 8. PERSPECTIVAS

O bloqueio da meiose oocitária durante o período de pré-maturação abre novas perspectivas para a avaliação de diversas substâncias que podem contribuir para o aumento da taxa de óocitos competentes após a maturação *in vitro* e que estão aptos a assegurar o desenvolvimento embrionário inicial. O efeito sinérgico promovido pela cilostamida e metades foliculares certamente contribuirá para a realização de futuros estudos visando aumentar a eficiência da MIV. Além disso, a quantificação dos níveis de AMPc no CCO, CC e óocito é importante para a elucidação do papel das diversas substâncias que atuam na regulação da meiose oocitária.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERT, C. L.; GITTENS, J. E.; O'BRIEN, M.J.; EPPIG, J. J.; KIDDER, G. M. Intercellular communication via connexin 43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. **Developmental Biology**, v. 233, p. 258–70, 2001.
- ADAM, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C. H.; GINTHER, O. J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 94, p. 177-188, 1992.
- ADASHI, E. Y. Endocrinology of the ovary. **Human Reproduction**, v. 9, p. 815-827, 1994.
- ALBUZ, F. K.; SASSEVILLE, M.; LANE, M.; ARMSTRONG, D. T.; THOMPSON, J. G. GILCHRIST, R. B. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction**, v. 25, p. 2999-3011, 2010.
- ANDERSON, E.; ALBERTINI, D. F. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. **The Journal of Cell Biology**, v. 71, p. 680–686, 1976.
- ASSIDI, M.; DUFORT, I.; ALI, A.; HAMEL, M.; ALGRIANY, O.; DIELEMANN, S.; SIRARD, MARC-ANDRE. Identification of Potential Markers of Oocyte Competence Expressed in Bovine Cumulus Cells Matured with Follicle-Stimulating Hormone and/or Phorbol Myristate Acetate *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 79, p. 209–222, 2008.
- AYALON, D.; TSAFRIRI, A.; LINDNER, H. R.; CORDOVA, T.; HARELL, A. Serum gonadotrophin levels in pro-oestrous rats in relation to the resumption of meiosis by the oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 31, n. 1, p. 51-58, 1972.

BAO, B.; GARVERICK, H.A.; SMITH, M.F.; SALFEN, B.E.; YOUNGGUIST, R.S. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v.56, p.1158-1168, 1997.

BARNETT, K. R.; SCHILLING, C.; GREENFELD, C. R.; TOMIC, D.; FLAWS, J. A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Humam Reproduction Update**, v. 12, p. 537-555, 2006.

BARRETA, M. H.; OLIVEIRA, J. F.C.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q.; GASPERIN, B. G.; SANDRI, L. R.; GONCALVES, P. B. D. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E2 and F2a. **Reproduction**, v. 136, p. 733–740, 2008.

BÉDARD, J.; BRÛLÉ, S.; PRICE, C.A.; SILVERSIDES, D.W.; LUSSIER, J.G. Serine protease inhibitor-E2 (SERPINE2) is differentially expressed in granulosa cells of dominant follicle in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64(2), p. 152-65, 2003.

BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K.; GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. **Biology of Reproduction**, v.66, p.120-126, 2002.

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. . Interação entre células do cumulus e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, p. 488-496, 2004.

BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J.; VAN DEN HURK, R.; IZADYAR, F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v. 47, p. 13-22, 1997.

BÉZARD, J. Aspects of *in vivo* and *in vitro* fertilization of the equine oocyte. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, v. 25, n. 1, p. 36-61, 1997.

BILODEAU-GOESEELS, S. Cows are not mice: role of cyclic AMP, phosphodiesterases and adenosine monophosphateactivated rotein kinase in the maintenanc of meiotic arrest of bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, p. 734-43 2011a.

BILODEAU-GOESEELS, S. Bovine oocyte meiotic inhibition before *in vitro* maturation and its value to *in vitro* embryo production: does it improve developmental competence? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 4, p. 687-693, 2011b.

BILODEAU-GOESEELS, S. Manganese inhibits spontaneous nuclear maturation via cAMP/protein kinase A pathway in bovine cumulus-enclosed oocytes. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 2, p. 12–21, 2003a.

BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 60, p. 1679–1690, 2003b.

BILODEAU-GOESEELS, S. Bovine Oocyte Meiotic Inhibition Before *In Vitro* Maturation and Its Value to In Vitro Embryo Production: Does it Improve Developmental Competence? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 687–693, 2012.

BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 41, p. 54-62, 1995.

BONNET, A.; DALBIÈS-TRAN, R.; SIRARD, M. A. Opportunities and challenges in applying genomics to the study of oogenesis and folliculogenesis in farm animals. **Reproduction**, v. 135, p. 119-128, 2008.

BORGES, A. M.; TORRES, C.; RUAS, J. R. M.; ROCHA JÚNIOR, V. R.; CARVALHO, G. R. Dinâmica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebu. **Arquivo Brasileiro Med. Vet. Zootec.**, v.53, n.5, p.1-13, 2001.

BREVINI-GANDOLFI, T.A.L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmatic componentes and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, p. 1255-1276, 2001.

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 66, p. 5–13, 2006.

BROEKMANS, F. J.; KNAUFF, E. A.; TE VELDE, E. R.; MACKLON, N. S.; FAUSER, B. C. Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 18, p. 58-65, 2007.

COLLEDGE, W. H., HE, C. L.; VANDE WOUDE, G. F. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. **Nature**, v. 370, n. 6484, p. 65-68, 1994.

CONTI, M.; ANDERSEN, C. B.; RICHARD, F.; MEHATS, C.; CHUN, S. Y.; HORNER, K.; JIN, C.; TSAFRIRI, A. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Mol Cell Endocrinology**, v. 187, p. 153–159, 2002.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. E. J. *In vitro* follicle growth: Achievements in mammalian species. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 36, p. 3-9, 2001.

CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; GALL, L. Meiotic competence of growing oocytes from adult goats. In: Lauria, A., Gandolfi, F., Enne, G., Gianaroli, L. (Eds.), *Gametes: Development and Function*, Sero Symposia, p. 195–202, 1998.

DE LOOS, F. A.; ZEINSTRA, E.; BEVERS, M. M. Follicular wall maintains meiotic arrest in bovine oocytes cultured *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 39, p. 162–165, 1994.

DE LOS REYES, M.; LANGEA, J. D. E.; MIRANDA, P.; PALOMINOS, J.; BARROS, C. Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods on *in vitro* maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v. 64, p. 1–11, 2005.

DE SMAELE, E.; ZAZZERONI, F.; PAPA, S.; NGUYEN, D.U.; JIN, R.; JONES, J.; CONG, R.; FRANZOSO, G. Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. **Nature**, Nov 15;414(6861):308-13, 2001.

DEKEL, N. Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. **Reviews of Reproduction**, v.1, n.2, p.82-8. 1996.

DIELEMAN, S. J.; HENDRIKSEN, P. J.; VIUFF, D.; THOMSEN, P. D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H. M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T. A.; NIEMANN, H.; GADELLA, B. M.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v. 57, p. 5-20, 2002.

DOWNS, S. M. Regulation of the G2/M transition in rodent oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, p. 566–585, 2010.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p. 1211-1239, 2001.

DRUMMOND, A.E. The role of steroids in follicular growth. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p. 1-11, 2006.

EDSON, M. A.; NAGARAJA, A. K.; MATZUK, M. M. The mammalian ovary from genesis to revelation. **Endocrinology Reviews**, v. 30, p. 624-712, 2009.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, p. 829-838, 2001.

ERICKSON, B. H. Development and Senescence of the Postnatal Bovine Ovary. **Journal of Animal Science**, v. 25, n. 3, p. 800-805, 1966.

EVANS, A.C.O.; FORTUNE, J.E. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of Messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. **Endocrinology**, v. 138, p. 2963–2971, 1997.

FAIR, T.; HULSHOF, S.C.J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Journal of Anatomy and Embryology**, v. 190, p. 327-336, 1997.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, p.437-442, 1995.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleolus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 43, p. 503-512, 1996.

FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. A. S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and

biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, v. 71, p. 836-848, 2009.

FERREIRA, R.; GASPERIN, B.; BOHRER, R.C.; GONÇALVES, P.B.D. The Role of Angiotensin II in Bovine Follicular Growth. **41th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction**. 714 ed. 41th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction: Society for the Study of Reproduction, p 240–241, 2008.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF (Org.). *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2. ed. São Paulo: Editora Roca, v. 1, p.303-327, 2008.

FISSORE, R. A., HE, C. L.; VANDE WOUDE, G. F. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, v. 55, n. 6, p. 1261-70, 1996.

FOOTE, W. D.; THIBAUT, C. Recherches experimentales sur la maturation *in vitro* des ovocytes de truie et de veau. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, v. 3, p. 329-349, 1969.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; EVANS, A.C.; TURZILLO, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, p.648-54, 2001.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 135-163, 2003.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, p.599–616, 2003.

GAUTIER, J.; MINSHULL, J.; LOHKA, M.; GLOTZER, M.; HUNT, T.; MALLER, J. L. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. **Cell**, v. 60, n. 3, p. 487-94, 1990.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 223-230, 1989.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996.

GIOMETTI, I. C.; BERTAGNOLLI, A. C.; ORNES, R. C.; DA COSTA, L. F.; CARAMBULA, S. F.; REIS, A. M.; DE OLIVEIRA, J. F.; EMANUELLI, I. P.; GONCALVES, P. B. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v. 63, p. 1014–1025, 2005.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, 2.ed. São Paulo, Roca, p. 303-327, 2008.

GORDON, I. Prenatal development of the bovine ovary. In: Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. **CAB International, Raven Press**, Cambridge, UK, p. 4349, 1994.

GOUGEON, A.; BUSSO, D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, p. 33-41, 2000.

GRUPEN, C. G.; FUNG, M.; ARMSTRONG, D. T. Effects of milrinone and butyrolactone-I on porcine oocyte meiotic progression and developmental competence. **Reproduction Fertility and Development**, v. 18, p. 309-317, 2006.

GUIXUE, Z.; LUCIANO, A. M.; COENEN, K.; GANDOLFI, F.; SIRARD, M. A. The influence of cAMP before or during bovine oocyte maturation on embryonic developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1733-1743, 2001.

HASHIMOTO, N.; WATANABE, N.; FURUTA, Y.; TAMEMOTO, H.; SAGATA, N.; YOKOYAMA, M.; OKAZAKI, K.; NAGAYOSHI, M.; TAKEDA, N.; IKAWA, Y.; Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice. **Nature**, v. 370, n. 6484, p. 68-71, 1994.

HOMA, S. T. Effects of cyclic AMPc on the spontaneous meiotic maturation of *cumulus*-free bovine oocytes cultured in the chemically defined medium. **Journal of Experimental Zoology**, v. 248, p. 222-231, 1988.

HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote**, v. 5, p. 371-376, 1997.

HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 38, p. 35-47, 1989.

IRVING-RODGERS, H.F.; KRUPA, M.RODGERS, R. J. Cholesterol side-chain cleavage cytochrome P540 and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression and the concentrations of steroid hormones in the follicular fluids of diferente phenotypes of healthy and atretic bovine ovarian follicles. **Biology of Reproduction**. Madison, v. 69, n. 6, p. 2022-2028, 2003.

JEE, B. C.; CHEN, H. Y.; CHIAN, R. C. Effect of a phosphodiesterase type 3 inhibitor in oocyte maturation medium on subsequent mouse embryo development. **Fertility and Sterility**, v. 91, p. 2037-2042, 2009.

JUENGEL, J. L.; HUDSON, N. L.; HEATH, D. A.; SMITH, P.; READER, K. L.; LAWRENCE, S. B.; O'CONNELL, A. R.; LAITINEN, M. P. E.; CRANFIELD, M.; GROOME, N. P.; RITVOS, O.; MCNATTY, K. P. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. **Biology Reproduction**, v. 67, p. 1777-1789, 2002.

KAWAMURA, K.; CHENG, Y.; WAMURA, N.; TAKAE, S.; OKADA, A.; KAWAGOE, Y.; MULDER, S.; TERADA, Y.; HSUEH, A. J. Pre ovulatory LH/hCG surge decreases C-

type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes. **Human Reproduction**, v. 26, n. 11, p. 3094-3101, 2011.

KOMAR, C.M.; BERNDTSON, A.K.; EVANS, A.C.; FORTUNE, J.E. Decline in circulating estradiol during the periovulatory period is correlated with decreases in estradiol and androgen, and in messenger RNA for p450 aromatase and p450 17alpha-hydroxylase, in bovine preovulatory follicles. **Biology of Reproduction**, v.64, n.6, p.1797-805, 2001.

KOSAKO,H.; GOTOH,Y.; NISHIDA,E. Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in Xenopus oocyte maturation. **EMBO Journal**, v. 13, n. 9, p. 2131-2138, 1994.

KOTSUJI, F.; KUBO, M.; TOMI NAGA, T. Effect of interactions between granulosa and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p.151-156, 1994.

KRUIP, T.; CRAN, D.; VAN BENEDEN, T.; DIELEMAN, S. Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vitro*. **Gamete Research**, v. 8, p. 28-47, 1983.

KUMAGAI, A.; DUNPHY, W. G. Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in Xenopus extracts. **Cell**, v. 70, n. 1, p. 139-51, 1992.

LE BEAUX, G.; RICHARD, F.J.; SIRARD, M. A. Effect of cycloheximidine, 6- DMAP, riscovitine and butyrolactone I on resumption of meiosis in porcine oocytes. **Theriogenology**, v .60, p. 1049-1058, 2003.

LEE, V. H. Expression of Rabbit Zona Pellucida Messenger Ribonucleic Acid During Early Follicular Development. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 401, 2000.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Follicular control of meiosis in the porcine oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 23, p. 705-709, 1980.

LI, J.; KIM, J.M.; LISTON, P.; LI, M.; MIYAZAKI, T.; MACKENZIE, A.E.; KORNELUK, R.G.; TSANG, B.K. Expression of Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) in Rat Granulosa Cells during Ovarian Follicular Development and Atresia. **Endocrinology**, v.139, n.3, p.1321- 1328, 1998.

LIU, L.; YANG, X. Interplay of Maturation-Promoting Factor and Mitogen-Activated Protein Kinase Inactivation during Metaphase-to-Interphase Transition of Activated Bovine Oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 1, p. 1-7, 1999.

LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; YANG, X.; BOLAND, M. Bovine Oocyte and Embryo Development Following Meiotic Inhibition With Butyrolactone I. **Molecular reproduction and Development**, v. 57, p. 204-209, 2000.

LUCCI, C. M.; SILVA, R. V.; CARVALHO, C. A.; FIGUEIREDO, R.; BÁO, N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 41, p. 61-69, 2001.

LUCIANO, A. M.; FRANCIOSI, F.; MODINA, S. C.; LODDE, V. Gap Junction-Mediated Communications Regulate Chromatin Remodeling During Bovine Oocyte Growth and Differentiation Through cAMP-Dependent Mechanism(s). **Biology of Reproduction**, v. 85, p. 1252-1259, 2011.

LUCIANO, A. M.; MODINA, S.; VASSENA, R.; MILANESI, E.; LAURIA, A.; GANDOLFI, F. Role of intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during *in vitro* maturation of bovine oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 465-472, 2004.

MAYES, M. A.; SIRARD, M. A. Effect of Type 3 and Type 4 Phosphodiesterase Inhibitors on the Maintenance of Bovine Oocytes in Meiotic Arrest. **Biology of Reproduction**, v. 66, 180-184, 2002.

McGEE, E. A.; HSUEH, A. J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, v. 21, p. 200–214, 2000.

MEHLMANN, L. M.; JONES, T. L.; JAFFE, L. A. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. **Science**, v. 297, p. 1343–1345, 2002.

MIHM, M.; AUSTIN, E.A.; GOOD, T.E.M.; IRELAND, J.L.H.; KNIGHT, P.G.; ROCHE, J.F.; IRELAND, J.J. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 811–819, 2000.

MIHM, M.; BLEACH, E.C.L. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n. 3-4, p. 217-237, 2003.

MINGOTI, G. Z.; GARCIA, J. M.; ROSA E SILVA, A. A. M. The effect of serum on *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes co-cultured with granulosa cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 2, p. 213-217, 1995.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. **Início do desenvolvimento humano**. Embriologia Clínica. Guanabara Koogan, 5 ed., p. 13-38, 1994.

NOGUEIRA D, CORTVRINDT R, DE MATOS DG, VANHOUTTE L, SMITZ J. Effect of phosphodiesterase type 3 inhibitor on developmental competence of immature mouse oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 2045-2052, 2003a.

NOGUEIRA, D.; CORTVRINDT, R.; DE MATOS, D. G.; VANHOUTTE, L.; SMITZ, J. Effect of phosphodiesterase type 3 inhibitor on developmental competence of immature mouse oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 2045-2052, 2003b.

NOGUEIRA D, CORTVRINDT R, EVERAERDT B, SMITZ J. Effects of long-term *in vitro* exposure to phosphodiesterase type-3 inhibitors on follicle and oocyte development. **Reproduction**, v.130, p.177-186, 2005.

NOGUEIRA, D.; RON-EL, R.; FRIEDLER, S.; SCHACHTER, M.; RAZIEL, A.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. Meiotic arrest *in vitro* by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 177–184, 2006.

NUTTINCK, F.; GAL, L.; RUFFINI, S.; LAFFONT, L.; CLEMENT, L.; EINAUD, P.; ADENOT, P.; GRIMARD, B.; CHARPIGNY, G.; MARQUANT-LE GUIENNE, B. PTGS2-related PGE2 affects oocyte MAPK phosphorylation and meiosis progression in cattle: late effects on early embryonic development. **Biology of Reproduction**, v. 84, p. 1248–1257, 2011.

OLIVEIRA E SILVA, I.; VASCONCELOS, R. B.; CAETANO, J. V. O.; GULART, L. V. M.; CAMARGO, L. S. A.; BAO, S. N.; ROSA, E SILVA, A. A. M. Induction of reversible meiosis arrest of bovine oocytes using a two-step procedure under defined and non-defined conditions. **Theriogenology**, v. 75, p. 1115–1124, 2011.

OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N.; TACHIKAWA, S.; SUZUKI, T. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. **Theriogenology**, v. 48, n. 5, p. 769-74, 1997.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, n. 1, p. 63-67, 1992.

PETERS, H. Some aspects of early follicular development. In: MIDGLEY, A.R.; SADLER, W.A. (Ed.), **Ovarian Follicular Development and Function**, New York: Raven Press, p. 1-15, 1979.

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

PINCUS, G.; E. V. ENZMANN. The Comparative Behavior of Mammalian Eggs *in Vivo* and *in Vitro*: I. The Activation of Ovarian Eggs. **Journal of Experimental Medicine**, v.62, n.5, p.665-75, 1935.

PRICE, C. A.; WEBB, R. Steroid control of gonadotropin secretion and ovarian function in heifers. **Endocrinology**, v.122, n.5, p. 2222-31, 1988.

RICHARD, F. J.; SIRARD, M. A. Effect of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 22–28, 1996.

RICHARD, F. J.; SIRARD, M. A. Effect of follicular cells on oocyte maturation. I: Effects of follicular hemisections on bovine oocyte maturation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 16–21, 1996a.

RICHARD, F. J.; SIRARD, M. A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 22–28, 1996b.

RICHARD, F. J.; SIRARD, M. A. Theca cell monolayers that inhibit maturation of bovine oocytes show differences in their protein secretion pattern. **Molecular Reproduction and Development**, v. 50, 200–206, 1998.

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

ROMERO, S.; J. SMITZ. Improvement of *in vitro* culture of mouse cumulus-oocyte complexes using PDE3-inhibitor followed by meiosis induction with epiregulin. **Fertility and Sterility**, v.93, n.3, p.936-44. 2010.

ROSE, R. D.; GILCHRIST, R. B.; KELLY, J. M.; THOMPSON, J. G.; SUTTON-McDOWALL, M. L. Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators. **Theriogenology**, v. 79, p. 142-148, 2013.

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v. 24, p. 77-92, 1983.

SADEU, J. C.; CORTVRINDT, R.; RON-EL, R.; KASTERTEIN, E.; SMITZ, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v. 85, p. 1130-1141, 2006.

SAGA, Y. Mouse germ cell development during embryogenesis. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 18, p. 337–341, 2008.

SASSEVILLE, M.; GAGNON, M. C.; GUILLEMETTE, C.; SULLIVAN, R.; GILCHRIST, R. B.; RICHARD, F. J. Regulation of gap junctions in porcine cumulus-oocyte complexes: contributions of granulosa cell contact, gonadotropins, and lipid rafts. **Molecular Endocrinology**, v. 23, p. 700–710, 2009.

SATO, E.; ISHIBASHI, T.; IRITANI, A. Meiotic arresting substance separated from porcine ovarian granulosa cells and hypothetical arresting mechanism of meiosis. In: Channing CP, Segal SJ (eds.), **Intra Ovarian Control Mechanisms**. New York: Plenum Publishing Corporation, p. 161-173, 1982.

SAUMANDE, J. La folliculogénèse chez les ruminants, **Veterinary Record**, v. 167, p. 205-218, 1991.

SICINSKI, P.; DONAHER, J. L.; GENG, Y.; PARKER, S. B.; GARDNER, H.; PARK, M. Y.; ROBKER, R. L.; RICHARDS, JU.; S.; MCGINNIS, L. K.; BIGGERS, J. D.; EPPIG, J. J.; BRONSON, R. T.; ELLEDE, S. J.; WEINBERG, R. A. Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. **Nature**. v. 384, p. 470-474, 1996.

SIQUEIRA, L. C.; BARRETA, M. H.; GASPERIN, B.; BOHRER, R.; SANTOS, J. T.; JUNIOR, J. B.; OLIVEIRA, J. F.; GONÇALVES, P. B. D. Angiotensin II, progesterone, and

prostaglandins are sequential steps in the pathway to bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v. 77, p. 1779–1787, 2012.

SHEIKH, M.S.; HOLLANDER, M.C.; FORNANCE, A.J.JR. Role of Gadd45 in apoptosis. **Biochemical Pharmacology**, v.59, n.1, p.43-45, 2000.

SHU, Y. M.; ZENG, H. T.; REN, Z.; ZHUANG, G. L.; LIANG, X. Y.; SHEN, H. W.; YAO, S. Z.; KE, P. Q.; WANG, N. N. Effects of cilostamide and forskolin on the meiotic resumption and embryonic development of immature human oocytes. **Human Reproduction**, v. 23, p. 504-513, 2008.

SIRARD, M. A. Temporary inhibition of *in vitro* meiotic resumption *in vitro* by adenylyate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 33, p. 757-767, 1990.

SIRARD, M. A.; BILODEAU, S. Effect of granulosa cell co-culture on invitro meiotic resumption of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 89, p. 459–465. 1990a;

SIRARD, M. A.; BILODEAU, S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 777–783, 1990b.

SIRARD, M. A.; COENEN, K. Effects of inhibition of meiotic resumption upon the subsequeute development of bovine oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Development**, v. 41, p. 255-262, 1994a.

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

SIRARD, M. A.; COENEN, K.; BILODEAU, S. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 37, p. 39–58, 1992.

SIRARD, M. A.; FLORMAN, H. M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; BARNES, F. L.; SIMS, M. L.; FIRST, N. L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 6, p. 1257-63, 1989.

SIRARD, M. A.; N. L. FIRST. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. **Biology of Reproduction**, v. 39, n. 2, p. 229-34, 1988.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, p. 126-136, 2006.

SOTO-SUAZO, M.; ZORN, T. M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Animal Reproduction**, v. 3, p.147-160, 2005.

SUH, C. S.; SONNTAG, B.; ERICKSON, G. F. The ovarian life cycle: A contemporary view. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 3, p. 5-12, 2002.

STROUD, B. The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic animals. Arizona, Estados Unidos. Statistics and date retrieval committee report, IETS, 2012.

TELFORD, N. A.; WATSON, A. J.; SCHULTZ, G. A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular Reproduction and Development**, v. 26, p. 90-100, 1990.

THIBAULT, D.; SZOLLOZI, D.; GÉRARD, M. Mammalian oocyte maturation. **Reproduction Nutrition Development**, v. 27, p. 865-896, 1987.

THOMAS, R. E.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. **Developmental Biology**, v. 244, n. 2, p. 215-25, 2002.

TORNELL, J.; BILLIG, H.; HILLENSJO, T. Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides. **Human Reproduction**, v. 6, p. 411– 422, 1991.

TOSTI, E. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p. 26, 2006.

TRIPATHI, A.; PREM KUMAR, K. V.; CHAUBE, S. K. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. **Journal of Cellular Physiology**, v. 223, p. 592–600, 2010.

TROUNSON, A.; ANDERIESZ, C.; JONES, G. Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 51-75, 2001.

TSAFRIRI, A.; CHANNING, C. P. An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis *in vitro*. **Endocrinology**, v. 96, p. 922-927, 1975.

TSAFRIRI, A.; CHUN, S. Y.; ZHANG, R.; HSUEH, A. J.; CONTI, M. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of Camp levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. **Developmental Biology**, v. 178, n. 2, p. 393-402, 1996.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717–1751. 2005.

VANHOUTTE, L.; DE SUTTER, P.; NOGUEIRA, D.; GERRIS, J.; DHONT, M.; VAN DER ELST, J. Nuclear and cytoplasmic maturation of *in vitro* matured human oocytes after temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor. **Human of Reproduction**, v. 22, p. 1239-1246, 2007.

VANHOUTTE, L.; NOGUEIRA, D.; DE SUTTER, P. Prematuration of human denuded oocytes in a three-dimensional co-culture system: effects on meiosis progression and developmental competence. **Human of Reproduction**, v. 24, p. 658–669, 2009a.

VANHOUTTE, L.; NOGUEIRA, D.; DUMORTIER, F.; DE SUTTER, P. Assessment of a new *in vitro* maturation system for mouse and human cumulus-enclosed oocytes: three-dimensional prematuration culture in the presence of a phosphodiesterase 3-inhibitor. **Human of Reproduction**, v. 24, p. 1946-1959, 2009b.L

VANHOUTTE, L.; NOGUEIRA, D.; GERRIS, J.; DHONT, M.; DE SUTTER, P. Effect of temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor on morphological and functional aspects of *in vitro* matured mouse oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 1021-1030, 2008.

VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. **Theriogenology**, v.59, p.571-584, 2003.

WASSARMAN, P. M.; ALBERTINI, D. F. Mammalian ovum. In knobil E, Neill J (EDS): **The Physiology of Reproduction**, cap. 3, p. 79-123. New York, Raven Press, 1994.

WEBB, R. J.; MARSHALL, F.; SWANN, K.; CARROLL, J. Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in [cAMP] and protein kinase a in mammalian oocytes. **Developmental Biology**, v. 246, p. 441–454, 2002.

WESSEL, G. M.; BROOKS, J. M.; GREEN, E.; HALEY, S.; VORONINA, E.; WONG, J.; ZAYDFUDIM, V.; CONNER, S. The biology of cortical granules. **International Review of Cytology**, v. 209, p. 117-206, 2001.

WILTBANK, M.C.; GUMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v.57, p.21-52, 2002.

WU, B.; IGNOTZ, G.; CURRIE, W. B.; YANG, X. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 1, p. 253-9, 1997.

WU, J.; TIAN, Q. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle *in vitro*. **Zygote**, v. 15, p. 233-240, 2007.

XU, Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, v.53, p.951-957, 1995.

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