



### Efeito do inibidor da fosfodiesterase tipo 3 na retenção da meiose durante a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos<sup>1</sup>

Ana Luiza Silva Guimarães<sup>2</sup>, Sidney Alcântara Pereira<sup>3</sup>, Margot Alves Nunes Dode<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Parte do experimento de mestrado do primeiro autor, financiado pela Embrapa

<sup>2</sup>Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – UnB, Brasília, Brasil, Bolsista da CAPES. e-mail: guimaraes.analuiza24@gmail.com

<sup>3</sup>Mestrando do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal – UnB, Brasília, Brasil, Bolsista da CAPES. email: xidsnt@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Pesquisadora, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil. e-mail: margot@cenargen.embrapa.br

**Resumo:** Este estudo objetivou avaliar o bloqueio da meiose em ovócitos usando a cilostamida, um inibidor da fosfodiesterase do tipo 3, no meio de maturação utilizado para a produção *in vitro* de embriões (PIV). Para isso, 908 ovócitos bovinos foram submetidos à maturação *in vitro* por 8 e 24 horas. Os tratamentos foram: 1) Controle (C), cultivo no meio de maturação; 2) Inibição sem hormônio (ISH), meio de maturação sem FSH e com cilostamida; 3) Inibição com hormônio (ICH), meio de maturação com FSH e cilostamida; 4) Inibição com o dobro de hormônio (IC2H), meio de maturação com dobro de FSH e cilostamida. Após o período de cultivo, os ovócitos foram corados para avaliação do estágio da meiose. Os dados foram analisados pelo teste do  $\chi^2$ . A cilostamida inibiu totalmente a retomada da meiose na presença e ausência de FSH por 8 horas, entretanto o aumento na concentração de FSH (IC2H) superou esse efeito inibitório e a maioria dos ovócitos retomou a meiose. Às 24 horas de cultivo 95,1 % dos ovócitos do grupo C estavam maduros (MII), já os cultivados na presença de cilostamida permaneciam bloqueados (VG). Os ovócitos do grupo IC2H que haviam retomado a meiose, às 24 horas apresentaram um atraso na progressão com 79,3% em MII. Os resultados sugerem que a retenção da meiose pode ser feita com sucesso usando a cilostamida no meio de maturação por 24 horas, podendo ser utilizado como uma alternativa para melhorar a competência de ovócitos utilizados para a PIV.

**Palavras-chave:** cilostamida, retenção meiótica, maturação nuclear

**Abstract:** This study aimed to evaluate the meiotic arrest in oocytes using cilostamide, a potent inhibitor of phosphodiesterase type 3, in the maturation medium used for the *in vitro* embryos production (IVP). For that, 908 bovine oocytes recovered from slaughter house ovaries, were submitted to *in vitro* maturation for 8 and 24 h. Treatments were: 1) Control (C), culture in maturation medium; 2) Inhibition no hormone (INH), maturation medium no FSH plus cilostamide; 3) Inhibition with hormone (IWH), maturation medium with hormones plus cilostamide; 4) Inhibition with double hormone (IW2H), maturation medium with double of hormone concentration plus cilostamide. After each culture period, oocytes were stained to assess the stage of meiosis. Data were analyzed by  $\chi^2$  test. Cilostamide completely inhibited resumption of meiosis in the presence or absence of FSH for 8 h, however an increase in FSH concentration (IW2H), overcame its inhibitory effect and the majority of the oocytes resumed meiosis. After 24 h of culture, 95.1% of the oocytes from the C group were mature (MII), while those cultured in presence of cilostamide remained blocked (VG). However, oocytes from IW2H group that had resumed meiosis, at 24 h, showed a delay in meiosis progression with only 79.3% in MII. These results suggest that the meiotic arrest can be successfully attained with cilostamide in maturation medium for 24 hours and can be used as an alternative to improve the competence of oocyte used for the IVP.

**Keywords:** cilostamide, meiotic arrest, nuclear maturation

#### Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIV) envolve três processos interdependentes que são a maturação (nuclear e citoplasmática), fecundação e cultivo embrionário. Embora os índices de maturação nuclear e de fecundação *in vitro* sejam elevados (80%), apenas 35-40% dos ovócitos bovinos maturados (MIV), fecundados (FIV) e cultivados *in vitro* (CIV) desenvolvem-se até o estágio de blastocisto. Esses dados demonstram que a maturação ainda é um dos problemas na PIV. Provavelmente deve-se ao fato de que, na MIV trabalha-se com uma população heterogênea de ovócitos coletados de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento e, portanto, com diferentes graus de competência (Jee et al., 2009). Considerando que quando os ovócitos são retirados dos folículos, eles automaticamente retomam a meiose e aqueles que não atingiram a competência, ou seja, ainda não completaram a maquinaria citoplasmática para suportar o desenvolvimento (Gilchrist & Thompson, 2007), não serão capazes de se tornar embriões viáveis.



Uma possível estratégia para melhorar os resultados da MIV seria inibir a retomada da meiose que ocorre logo após serem retirados do ambiente folicular (Vanhoute et al., 2008), proporcionando aos ovócitos um tempo adicional para que os mesmos possam adquirir a competência para desenvolvimento. Vários métodos fisiológicos e farmacológicos podem ser utilizados para inibir a retomada da meiose, sendo que os fisiológicos, em geral, são de duração mais curta e menos eficientes do que os farmacológicos. As fosfodiesterases do tipo 3 (PDE-3) são conhecidas por sua alta expressão dentro do ovócito e ser responsável pela hidrólise da adenosina monofosfato cíclico – AMPc, que está envolvida na regulação da maturação do ovócito (Jee et al. 2009). A inibição da meiose com agentes específicos da PDE-3 mantêm os níveis de AMPc altos e faz com que o ovócito fique retido em vesícula germinativa. Entretanto, na maioria dos estudos essas substâncias são utilizadas inicialmente em um meio de inibição e posteriormente transferidas para o meio de maturação, que possui hormônios e demais componentes benéficos ao ovócito que estimula a maturação. Se a retenção pudesse ser realizada no próprio meio de maturação, as condições oferecidas ao ovócito seriam mais adequadas para que esse pudesse se preparar para a maturação completa. Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da cilostamida, um potente inibidor da fosfodiesterase do tipo 3, como bloqueador da meiose por diferentes momentos durante a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos.

#### Material e Métodos

Ovários de fêmeas bovinas mestiças (*Bos indicus X Bos taurus*) foram coletados em abatedouro local e os Complexos *Cumulus* Ovócito (COC) foram aspirados de folículos entre 3-8 mm de diâmetro. Somente os COCs que apresentavam citoplasma homogêneo e pelo menos três camadas de células do *cumulus* foram utilizados, sendo um total de 908. O meio de maturação básico utilizado foi TCM-199 com sais de Earl's, suplementado com 10% de soro fetal bovino, L-glutamina, amicacina e FSH (0,01UI/mL). Nos tratamentos com inibidor foi adicionado ao meio a cilostamida em uma concentração de 20µM. Uma vez selecionados, os COC foram lavados para a retirada do excesso de líquido folicular e em seguida, alocados para os diferentes tratamentos: Controle (C), ovócitos cultivados no meio de maturação; 2) Inibição sem hormônio (ISH), ovócitos cultivados no meio de maturação em que foi suprimida a adição de FSH e adicionada a cilostamida; 3) Inibição com hormônio (ICH), ovócitos cultivados em meio de maturação suplementado com cilostamida; 4) Inibição com o dobro de hormônio (IC2H), ovócitos cultivados em meio de maturação suplementado com 0,02UI/mL de FSH e cilostamida. Para avaliar a eficiência e duração do bloqueio os ovócitos foram cultivados por 0, 8 e 24 horas. Em cada um desses momentos ovócitos foram retirados do meio de maturação e desnudados por sucessivas pipetagens. Os ovócitos desnudos foram fixados em solução de fixação (etanol e ácido acético 3:1) por 48 horas. Após este período os ovócitos foram corados com lacmóide (1% em ácido acético glacial) e observados em microscópio de contraste de fase para a determinação do estágio da meiose. Os ovócitos foram classificados de acordo com a configuração da cromatina em vesícula germinativa (VG), vesícula germinativa rompida (VGBD), metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI) e metáfase II (MII) e degenerados/anormais. Foram considerados imaturos os que estavam em VG, maduros os em MII, os intermediários aqueles que se apresentavam em outros estágios e os que apresentavam qualquer tipo de alteração em degenerados/anormais. Os dados foram analisados utilizando o teste do  $\chi^2$ .

#### Resultados e Discussão

A avaliação de ovócitos a 0 hora de maturação, ou seja, antes de serem colocados para maturar, mostrou que 97,5% apresentavam-se em estágio de vesícula germinativa (VG), que é o estágio que se encontram dentro do folículo ovariano antes de serem estimulados para retomar a meiose. Após 8 horas de maturação, no grupo controle a maioria dos ovócitos tinha retomado a meiose e apresentavam vesícula germinativa rompida. A presença de cilostamida, independente de ter ou não FSH no meio, inibiu ( $P>0,05$ ) a retomada da meiose (Tabela 1). Esses resultados evidenciam que o inibidor da fosfodiesterase do tipo 3 mantêm os altos níveis intracelulares de AMPc, essenciais para o bloqueio da meiose (Ozawa et al. 2008; Thomas et al., 2004). Quando a quantidade de FSH foi aumentada os ovócitos sofreram a quebra da vesícula germinativa (VGBD) sendo semelhante ao grupo controle (Tabela 1). Isso mostra que uma dose elevada de FSH foi capaz de superar o efeito inibitório da cilostamida e induzir uma diminuição do AMPc. Em relação aos tratamentos de 24 horas, no grupo controle 93,1% dos ovócitos atingiram o estágio de metáfase II. Os tratamentos com e sem FSH, não diferem entre si em relação à retenção dos ovócitos em VG às 8 horas e em 24 horas, a percentagem de ovócitos imaturos foi semelhante ( $P>0,05$ ) ao grupo C a 0 hora. O tratamento com o dobro da concentração de FSH no meio apresentou a maioria dos ovócitos em MII, entretanto a taxa de maturação foi inferior a do grupo controle sendo que em torno de 20% dos ovócitos ainda não tinha completado a meiose. Esses resultados sugerem que ao utilizar o dobro da dose de FSH, este é capaz de estimular a maturação do ovócito, mas de alguma forma atrasa o término da meiose I. Esta é uma informação importante se a cilostamida for mantida no meio de maturação a ser utilizado após o bloqueio, pois um prolongamento no tempo de maturação deverá ser utilizado. Apesar da taxa de ovócitos anormais ou degenerados



terem sido estatisticamente diferente entre alguns grupos, a porcentagem foi baixa em todos e pode ser considerada dentro do esperado em qualquer sistema de maturação in vitro.

Tabela 1: Avaliação da maturação nuclear de ovócitos bovinos cultivados no meio de maturação (MIV) suplementado com cilostamida (I), com e sem hormônio (H) e o dobro da concentração de hormônio (2H), por 0, 8 e 24 horas (h).

Tratamento	Nº total de ovócitos	Estágio da meiose				
		VG N(%)	VGBD N (%)	MI, AI, TI, N(%)	MII, N (%)	Anormal/degenerado N (%)
Controle 0h	82	80 (97,5) <sup>a</sup>	1 (1,21) <sup>a,c</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	1 (1,21) <sup>a,b</sup>
Controle 8h	101	3 (2,97) <sup>b,c</sup>	94 (93,06) <sup>b</sup>	4 (3,96) <sup>a,b</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>
MIV+I 8h	104	102(98,0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	2 (1,92) <sup>a,b</sup>
MIV+I+H 8h	110	103 (93,63) <sup>a</sup>	7 (6,36) <sup>c</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>
MIV+I+2H 8h	105	9 (8,57) <sup>b</sup>	92 (87,61) <sup>b</sup>	4 (3,80) <sup>a,b</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>
Controle 24h	102	0 (0) <sup>c</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	6 (5,88) <sup>b</sup>	95 (93,13) <sup>b</sup>	1 (0,98) <sup>a,b</sup>
MIV+I 24h	100	98 (98) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	2 (2) <sup>a,b</sup>
MIV+I+H 24h	101	92 (91,08) <sup>a</sup>	6 (5,88) <sup>c</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	3 (2,97) <sup>a,b</sup>
MIV+I+2H 24h	103	0 (0) <sup>c</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	22 (21,35) <sup>c</sup>	77 (79,31) <sup>c</sup>	4 (3,88) <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup> Diferentes letras na mesma coluna indicam diferenças significativas por  $\chi^2$ . (P<0,05).

VG: vesícula germinativa; VGBD: rompimento da vesícula germinativa; MI, AI e TI: metáfase I, anáfase I e telófase I; MII: metáfase II.

### Conclusões

O presente estudo mostrou que a cilostamida bloqueou a meiose em ovócitos cultivados no meio de maturação in vitro por um período de até 24 horas, e pode ser utilizada para melhorar a competência dos ovócitos a serem utilizados na PIV. Entretanto, se a mesma for mantida para a maturação após o bloqueio a adição do dobro de FSH em combinação com período mais prolongado de cultivo deve ser utilizada.

### Literatura citada

GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v. 67, p.6-15, 2007.

JEE, B.C.; CHEN, H.Y.; CHIAN, R.C. Effect of phosphodiesterase type 3 inhibitor in oocyte maturation medium and subsequent mouse embryo development. **Fertility and Sterility**, v.91, n. 5, p. 2037-2042, 2009.

OZAWA, M.; NAGAI, T.; SOMFAI, T. et al. Comparasion between effects of 3- Isobutyl 1- Methyxantine and FSH on gap junctional communication, LH- receptor expression, and meiotic maturation of cumulus-oocyte complexes in pigs. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 857-866, 2008.

THOMAS, R.E.; ARMSTRONG, D.T.; GILCHRIST, R.B. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3', 5' monophosphate levels. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 548-556, 2004.

VANHOUTTE, L.; NOGUEIRA, D.; GERRIS, J. et al. 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.