

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA**

**O SISTEMA PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS ESTÁ
PRESENTE NO COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO
E REGULA O REINÍCIO DA MEIOSE EM
BOVINOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Matheus Pedrotti De Cesaro

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**O SISTEMA PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS ESTÁ
PRESENTE NO COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO E
REGULA O REINÍCIO DA MEIOSE EM BOVINOS**

por

Matheus Pedrotti De Cesaro

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Fisiopatologia da Reprodução, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Paulo Bayard Dias Gonçalves

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Pedrotti De Cesaro, Matheus

O SISTEMA PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS ESTÁ PRESENTE NO COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO E REGULA O REINÍCIO DA MEIOSE EM BOVINOS / Matheus Pedrotti De Cesaro.-2013.

77 p.; 30cm

Orientador: Paulo Bayard Dias Gonçalves

Coorientador: João Francisco Coelho de Oliveira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2013

1. Peptídeos Natriuréticos 2. Complexo Cumulus-Oócito
3. Reinício da Meiose 4. Expansão do Cumulus 5. Forskolin
I. Dias Gonçalves, Paulo Bayard II. Coelho de Oliveira,
João Francisco III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**O SISTEMA PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS ESTÁ PRESENTE
NO COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO E REGULA O REINÍCIO
DA MEIOSE EM BOVINOS**

elaborada por
Matheus Pedrotti De Cesaro

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Paulo Bayard Dias Gonçalves, Dr.
(Presidente/Orientador)

Arnaldo Diniz Vieira, Dr. (UFPEl)

Fábio Gallas Leivas, Dr. (UNIPAMPA)

Santa Maria, 20 de fevereiro de 2013

AGRADECIMENTOS

Principalmente aos meus maravilhosos pais, Volmar De Cesaro e Inês Pedrotti De Cesaro, pelo apoio, amor, carinho e ajuda incondicional em todos os momentos, pela educação e valores ensinados. Da mesma forma aos meus irmãos: Marcelo, Mahiara e Marccos e aos meus avós: Arlindo e Genny Pedrotti.

Aos que partiram, Liberato e Maria De Cesaro (*in memoriam*).

Aos demais membros da minha família, em especial ao Tio Volmir pelo respeito e admiração e meu primo Mauro Baccin Júnior pela amizade.

Aos meus orientadores, Paulo Bayard Dias Gonçalves e João Francisco Coelho de Oliveira, pela grande contribuição com a minha formação pessoal e profissional, amizade, confiança e respeito. Pelo exemplo da incansável busca pelo conhecimento e dedicação à pesquisa.

Ao BioRep, aos colegas de pós-graduação e estagiários (especialmente a Mariana, Charles e Vitor) pelos ensinamentos constantes, companheirismo, convivência, amizade e pelo ambiente maravilhoso de trabalho.

Ao Paulo e Murilo, companheiros de república, pelo aprendizado, convívio e amizade.

Ao Frigorífico Silva por disponibilizar os ovários para realização dos experimentos.

A Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV) pela possibilidade do estudo de qualidade. E a secretária do PPGMV Maria Moro da Rosa pelo apoio administrativo.

Ao CNPq, FAPERGS e CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

O SISTEMA PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS ESTÁ PRESENTE NO COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO E REGULA O REINÍCIO DA MEIOSE EM BOVINOS

AUTOR: MATHEUS PEDROTTI DE CESARO

ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria 20 de fevereiro de 2013.

O processo de retomada da meiose no oócito, bloqueada desde a vida fetal, e a expansão de compactas camadas de células do cumulus que o envolvem é desencadeado por mediadores intrafoliculares estimulados pelo LH, sendo eventos extremamente complexos. Em camundongos, dentre os componentes do sistema peptídeos natriuréticos (NP) somente o NP tipo C (CNP) apresenta função, bloqueando a retomada da meiose. Entretanto, em espécie monovular, o conhecimento sobre a ação dos NP, na maturação nuclear de oócitos e expansão do cumulus, é extremamente escasso. O objetivo do presente estudo foi caracterizar o sistema peptídeo natriurético, demonstrar sua função na retomada da meiose e expansão do cumulus, além de propor um novo modelo para estudo da expansão do cumulus. Inicialmente, demonstramos a presença de RNAm para ANP, CNP, receptor peptídeo natriurético 1 (NPR-1), NPR-2 e NPR-3 nas células do cumulus, sendo que no oócito somente foi detectado RNAm do NPR-2. Utilizando um modelo *in vitro*, no qual os oócitos permanecem bloqueados em vesícula germitava (VG) por ação do forskolin (100 μ M), demonstramos que os ANP, BNP e CNP, isoladamente ou em associação, induzem o reinício da meiose após 12 h de maturação. Em outros experimentos, observamos que a concentração de 100 μ M de forskolin inibiu, por 12 h, a expansão das células do cumulus estimulada por FSH e que o ANP, BNP e CNP revertem o efeito inibitório do forskolin sobre a expansão do cumulus. Dessa forma, demonstramos pela primeira vez a localização de RNAm para o sistema NP em CCOs. Além disso, foi demonstrado que em espécie monovular, utilizando o bovino como modelo animal, os peptídeos natriuréticos (ANP, BNP e CNP) apresentam função de mediadores intrafoliculares do LH, na qual estimulam a retomada da meiose e expansão do cumulus.

Palavras chave: Peptídeos natriuréticos, reinício da meiose, expansão do cumulus, forskolin.

ABSTRACT

Master Course Dissertation
Professional Graduation Program in Veterinary Medicine
Universidade Federal de Santa Maria

THE NATRIURETIC PEPTIDES SYSTEM IS PRESENT IN THE CUMULUS-OOCYTE COMPLEX AND REGULATE MEIOTIC RESUMPTION IN BOVINE

AUTHOR: MATHEUS PEDROTTI DE CESARO

ADVISER: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Defense Place and Date: Santa Maria, February 20nd, 2013

The process of meiotic resumption in oocytes, arrested since fetal life, and the expansion of compact layers of cumulus cells is triggered by intrafollicular mediators stimulated by LH. These events are extremely complex. In mice, among system components of natriuretic peptides (NP), only the C-type NP (CNP) has a role to inhibit the resumption of meiosis. However, little is known about the function of NPs on resumption of meiosis, nuclear maturation and cumulus expansion in monovular species. The aim of this study was to characterize the natriuretic peptide system, studying its role in the resumption of meiosis and cumulus expansion. We also proposed a new model to study cumulus expansion. Initially, we detected the presence of mRNA for the ANP, CNP, natriuretic peptide receptor 1 (NPR-1), NPR-2 and NPR-3 in the cumulus cells and NPR-2 mRNA in the oocyte. Using an *in vitro* model, in which the oocytes are arrested in germinal vesicle (VG) by the action of forskolin (100 μ M), we demonstrated that ANP, BNP and CNP, alone or in combination, induce resumption of meiosis after 12 h of maturation. In another experiment, we observed that the concentration of 100 μ M forskolin inhibited cumulus expansion stimulated by FSH for 12 h, which was reversed by adding ANP, BNP and CNP in the COC culture system. Thus, we demonstrated for the first time the localization of mRNA for the NP system in COCs. Furthermore, we found that the ANP, BNP and CNP are likely mediators of LH to induce meiotic resumption and cumulus expansion in monovular species, using the bovine as the animal model.

Key words: Natriuretic peptides, germinal vesicle breakdown, cumulus expansion, forskolin.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO - 1

FIGURE 1 – Effect of ANP, BNP and CNP in preventing the oocyte meiotic resumption in cattle. (A) Percentage of GV oocytes arrested during 12 hours of *in vitro* maturation. (B) The rate of GVBD after 12 hours of *in vitro* maturation in the presence of ANP, BNP or CNP at different concentrations (10, 100 and 1000 nM). (C) The rate of GVBD after 12 hours of *in vitro* maturation in the presence of 1000 nM of ANP, BNP and CNP combined. The experiments were performed in triplicate.....37

FIGURE 2 – Effect of the ANP and/or CNP on meiotic resumption in bovine oocytes inhibited by forskolin (100 μ M). (A) Dose-response effect (10, 100 and 1000 nM) of ANP and CNP. (B) Effect of the combination of ANP (1000 nM) and CNP (1000 nM) in stimulating resumption of meiosis. The experiments were performed in triplicate. Different letters indicate statistical significance ($P \leq 0.05$) between groups.....38

FIGURE 3 – Effect of BNP and its combinations with ANP and CNP in stimulating meiotic resumption in bovine oocytes inhibited with forskolin (100 μ M). (A) Dose-response effect (10, 100 and 1000 nM) of BNP. (B) Combination of ANP (1000 nM), BNP (10 nM) and CNP (1000 nM) in stimulating the resumption of meiosis. The experiments were performed in triplicate. Different letters indicate statistical significance ($P \leq 0.05$) between groups.....39

RESULTADOS COMPLEMENTARES

FIGURA 4 – Modelo para estudo da expansão do cumulus oophorus, na qual foi mensurado a área total de cada CCO antes (0 h) e após 12 e 24 h do início do cultivo *in vitro*. Para o experimento foi utilizado 0,5 µg/ml de FSH e 100 µM de forskolin. O experimento foi realizado em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).....64

FIGURA 5 – Dose-resposta do ANP e CNP na expansão do cumulus oophorus em bovino. A área total de cada CCO foi mensurada antes (0 h) e após 12 h do início do cultivo *in vitro*. Para este experimento, foi utilizado 0,5 µg/ml de FSH em todos os grupos e 100 µM de Forskolin exceto no controle positivo (Cont+). Além disso, utilizou-se três diferentes concentrações (10, 100 e 1000 nM) de ANP e CNP. O experimento foi realizado em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).....66

FIGURA 6 – Dose-resposta do BNP na expansão do cumulus oophorus em bovino. A área total de cada CCO foi mensurada antes (0 h) e após 12 h do início do cultivo *in vitro*. Para este experimento, foi utilizado 0,5 µg/ml de FSH em todos os grupos e 100 µM de forskolin exceto no controle positivo (Cont+). Além disso, utilizou-se três diferentes concentrações (10, 100 e 1000 nM) de BNP. O experimento foi realizado em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).....67

LISTA DE TABELAS

TABLE 1 - Primers used in the expression analysis for system natriuretic peptide characterization experiment.....	35
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AngII: Angiotensina II

ANP: Peptídeo natriurético tipo A

Areg: Anfirregulina

AGTR2: Receptor tipo 2 da angiotensina II

AI: Anáfase I

BNP: Peptídeo natriurético tipo B

Btc: Betacelulina

CNP: Peptídeo natriurético tipo C

cAMP / AMPc: Adenosina monofosfato cíclico

CC: cumulus cells

CCO's / COCs: Complexo cumulus-oócito / Cumulus oocyte-complex

cGMP / GMPc: Guanosina monofosfato cíclico

DO: denuded oocytes

EGF: Fator de crescimento epidermal

EGF-like growth factors: Fatores de crescimento semelhante ao EGF

Ereg: Epirregulina

ERK1: Quinase regulada por sinal extracelular-1

ERK2: Quinase regulada por sinal extracelular-2

GVBD: Germinal vesicle breakdown

LH: Hormônio luteinizante

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógenos

MPF: Fator promotor da maturação

MI: Metáfase I

MII: Metáfase II

NP: Peptídeos natriuréticos

PDE: Fosfodienterase

PKA: Proteína quinase-A

TI: Telófase I

VG: Vesícula germinativa

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
Capítulo - 1	7
Resultados Complementares.....	8
Lista de Tabela.....	9
Lista de Abreviaturas	10
SUMÁRIO	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Maturação nuclear oocitária.....	14
2.2 Peptídeos Natriuréticos	17
3 CAPÍTULO 1	21
4 CAPÍTULO 2.....	40
5 RESULTADOS COMPLEMENTARES.....	62
5.1 Experimento I: Efeito do forskolin na expansão do cumulus oophorus em bovinos	62
5.2 Experimento II: Efeito dos peptídeos natriuréticos na expansão do cumulus oophorus em bovino.....	65
6 CONCLUSÃO	68
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1 INTRODUÇÃO

As fêmeas domésticas contêm centenas de gametas no estágio de diplóteno da primeira prófase meiótica no ovário ao longo de sua vida. As biotécnicas direcionadas a multiplicação de fêmeas de elevado valor econômico tem como foco principal a utilização desses gametas de uma maneira mais eficiente do que a fisiológica. Por outro lado, métodos eficazes para o controle da ovulação em humanos e animais de estimação têm sido uma demanda social relevante.

Em mamíferos, os processos de expansão das células do cumulus e retomada da meiose são extremamente influenciados pelo pico pré-ovulatório do LH. De maneira que, as células do cumulus permanecem compactas e a maturação do oócito bloqueada durante o desenvolvimento folicular. Entretanto, a ausência de receptores para LH no complexo cumulus-oócito (CCOs) (Peng *et al.*, 1991) sugere que esta gonadotrofina não atue diretamente no gameta feminino, mas sim, estimulando a produção de mediadores intrafoliculares que desencadeiam tais funções. Os *EGF-like growth factors*, como Areg, Ereg e Btc foram recentemente apontados como principais mediadores dos efeitos do LH sobre a expansão do cumulus, maturação de oócitos e ovulação (Park *et al.*, 2004; Romero e Smitz, 2010). Além dos fatores promotores da maturação, o reinício da meiose também é regulado por fatores inibidores produzido pelas células foliculares. Este fato pode ser evidenciado pela manutenção de oócitos em vesícula germinativa (VG), quando co-cultivados com metades foliculares ou em meio condicionado pelas mesmas (Sirard e First, 1988; Richard e Sirard, 1996; Giometti *et al.*, 2005; Barreta *et al.*, 2008). Porém, ainda existem muitas lacunas para a elucidação desse processo, sendo que seu entendimento é de grande importância para técnicas de reprodução assistida que envolvem CCOs.

Recentemente, foi demonstrado, em camundongos, que dentre os peptídeos natriuréticos (NP), somente o peptídeo natriurético tipo C (CNP) tem função de manter a meiose bloqueada por inibir a PDE3 do oócito (Zhang *et al.*, 2010). Esse peptídeo faz parte do sistema dos NP, que consiste de três distintos peptídeos endógeno: ANP, BNP e CNP, além de três receptores localizados na superfície da célula alvo: receptor NP-1 (NPR-1), NPR-2 e NPR-3 (Yasoda *et al.*, 2004; Potthast e Potter, 2005; Gardner *et al.*, 2007; Nishikimi *et al.*, 2011). Da mesma forma, em espécies multiovar, foi demonstrado que CNP estimula o crescimento de folículos

pré-antrais e antrais (Sato *et al.*, 2012), e também é essencial para manter a meiose bloqueada em folículos iniciando a formação do antro (Tsuji *et al.*, 2012). Com o crescimento folicular, a expressão de CNP também é aumentada, atingindo os níveis mais elevados concomitantemente com o pico pré-ovulatório do LH (Kawamura *et al.*, 2011), quando estimula a produção de Areg, os quais inibem a expressão de CNP, chegando aos níveis basais para que ocorra o reinício da meiose (Tsuji *et al.*, 2012).

Apesar dos grandes avanços, no que diz respeito ao CNP e maturação nuclear observados em espécies multiovular, há uma carência de conhecimentos sobre a caracterização desse sistema nos CCOs e a função de ANP, BNP e CNP na maturação nuclear em espécie monovular, como a bovina. Além disso, até o momento não há relato dos NP na expansão do cumulus.

Nosso grupo demonstrou que, no folículo, a angiotensina II (AngII), atuando via receptor tipo 2 (AGTR2), é responsável por estimular o reinício da meiose em bovinos (Giometti *et al.*, 2005; Stefanello *et al.*, 2006; Barreta *et al.*, 2008). No sistema circulatório, AngII via AGTR2 e NP possuem funções semelhantes (Paulis e Unger, 2010) sugerindo que os NP no ambiente folicular de bovinos possam apresentar funções contrárias àquelas observadas em camundongos. Dessa forma, através de diversos experimentos *in vitro*, buscou-se responder perguntas relacionadas a caracterização do sistema NP nos CCOs e das funções do ANP, BNP e CNP nos processos de maturação nuclear e expansão do cumulus em bovinos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Maturação nuclear oocitária

Os oócitos são derivados das células germinativas primordiais, as quais, ainda no desenvolvimento fetal, transformam-se em oogônias que, por sua vez, diferenciam-se das outras células por apresentarem um citoplasma claro, devido a pouca quantidade de organelas e uma alta frequência de divisão mitótica, podendo chegar a 2.700.000 oogônias no dia 110 de gestação em bovinos, entretanto, aproximadamente 95% dos oócitos são perdidos até o nascimento (Erickson, 1966). Segundo Motta *et al.* (1997), muitos oócitos sofrem processos degenerativos como resultados de erros genéticos ocorridos durante o “*crossing over*” ou devido a distúrbios metabólicos e/ou vasculares. Na fêmea bovina, em torno dos 72-82 dias de gestação, alguns oócitos já iniciam a primeira prófase meiótica, passando então pelos estádios de leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno, no qual ocorre o primeiro bloqueio da meiose, também denominado estágio de dictióteno da prófase I ou de vesícula germinativa (VG) (Richards, 1980).

Em muitas espécies de mamíferos, o início da meiose acontece durante a vida fetal, na qual o oócito permanece no estágio de VG até o folículo se tornar atrésico ou se desenvolver e ser capaz de induzir a ovulação (Sirard *et al.*, 1989) pela estimulação da secreção do pico ovulatório do LH. A maturação do oócito tem por objetivo formar uma célula haplóide (bloqueada em metáfase II - MII), apta a ser fecundada, e que tenha capacidade para suportar os primeiros estágios de desenvolvimento embrionário, até a ativação do seu genoma. Os oócitos bovinos adquirem progressivamente a competência meiótica (capacidade de reiniciarem a meiose), a qual é completa quando atingem 110 – 115 μm , em folículos com 2-3 mm de diâmetro (Fair *et al.*, 1995; Otoi *et al.*, 1997). *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. Porém, *in vitro*, esse processo é desencadeado independentemente de hormônios, simplesmente pela remoção do oócito competente do ambiente folicular (Pincus e Enzmann, 1935). A interação entre oócito, células da granulosa e células da teca, pela liberação de fatores autócrinos e parácrinos, determina o controle do desenvolvimento folicular e maturação oocitária (Eppig, 2001). Esses fatos evidenciam que no folículo são produzidos fatores inibitórios que impedem a maturação nuclear, e que com o surgimento do LH ovulatório a maquinaria das células foliculares é alterada, cessando a

produção de inibidores e estimulando a síntese de fatores promotores da meiose (Downs, 2010).

O reinício da meiose, tanto *in vivo* como *in vitro*, inicia pela dissolução da membrana nuclear e condensação da cromatina no processo denominado de *germinal vesicle breakdown* (GVBD), progredindo sucessivamente para os estádios de MI, AI, TI e MII, na qual ocorre o segundo bloqueio da meiose (Sirard *et al.*, 1989). O tempo requerido para a maturação nuclear varia entre as espécies. No bovino, a GVBD 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).

A regulação da meiose em bovinos é extremamente complexa, incluindo eventos de fosforilação e de desfosforilação. O armazenamento de RNAm, através do encurtamento da cauda poli-A, principalmente para o fator promotor da maturação (MPF) é necessário para conferir competência para o oócito. O MPF é uma proteína de 79kD composta por duas subunidades catalítica (34kD) conhecida como p34Cdc2 kinase, e uma subunidade regulatória (45kD) conhecida como ciclina B (Gautier *et al.*, 1990). Para a ativação do MPF, a treonina-14 e a tirosina-15 da subunidade catalítica devem ser desfosforiladas pela enzima Cdc25 fosfatase (Kumagai e Dunphy, 1992). Os oócitos em fase de crescimento têm níveis baixos de p34Cdc2 e não progridem da fase G2 (intervalo entre síntese de DNA e divisão celular) para a fase M (divisão celular, meiose), entretanto, no final da fase de crescimento há um grande aumento na concentração e atividade da p34Cdc2, o que confere a competência meiótica (Chesnel e Eppig, 1995; De Vant'ery *et al.*, 1996). A quantificação dos níveis de MPF durante a maturação foi possível devido a sua forte afinidade pela quinase da histona H1 como substrato. Durante a GVBD, 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).

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 (ERK1) e ERK2, sendo a última isoforma mais abundantemente expressa em oócitos bovinos (Trounson *et al.*, 2001). O momento da ativação da MAPK varia nas diferentes espécies, de modo que é ativada em consequência da fosforilação de uma tirosina e uma treonina durante a maturação do oócito (Kosako *et al.*,

1994). Nos bovinos, a MAPK é ativada na GVBD, tendo sua atividade máxima em MI e 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).

Além dos fatores promotores da maturação, o reinício da meiose também é regulado por fatores inibidores produzido pelas células foliculares. Esse fato pode ser evidenciado pela manutenção de oócitos em VG quando co-cultivados com metades foliculares ou em meio condicionado pelas mesmas (Sirard e First, 1988; Richard e Sirard, 1996; Giometti *et al.*, 2005; Barreta *et al.*, 2008). Com esse mesmo modelo, o nosso laboratório demonstrou que a angiotensina II (AngII) é capaz de reverter o efeito inibitório das células foliculares na maturação do oócito (Giometti *et al.*, 2005). Além disso, a administração de um antagonista dos receptores da AngII (saralasin) em folículos pré-ovulatórios *in vivo* é capaz de bloquear o reinício da meiose induzido por GnRH/LH (Barreta *et al.*, 2008), confirmando o importante papel da AngII na maturação nuclear de oócitos bovinos.

A adenosina monofosfato cíclica (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 (célula germinativa) e nas células somáticas (células da teca, granulosa e cumulus), devido a diferentes localizações de fosfodienterasas (PDE) (Tsafriri *et al.*, 1996). Nos bovinos, altos níveis de AMPc no oócito causa um atraso no reinício da meiose, mas não impede a progressão à MII (Sirard e First, 1988). Esse evento é correlacionado com a proteína quinase-A (PKA), a qual é dependente de AMPc (Sirard, 1990). 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, CCO de camundongo cultivados na presença de um inibidor de PDE3 apresentam o reinício da meiose totalmente bloqueada (Romero e Smitz, 2010).

A regulação dos eventos responsáveis pela retomada da divisão meiótica e completa maturação do oócito ainda não foram completamente elucidados. *In vivo*, provavelmente o pico de LH seja um sinal comum para ativar o MPF e a MAPK promovendo a maturação dos oócitos (Dekel, 1996). Porém, a ausência de receptores de LH no oócito e no cumulus (Peng *et al.*, 1991) sugere que essa gonadotrofina não atue diretamente no gameta feminino, mas estimule a produção de fatores intrafoliculares que induzem a GVBD. No entanto, os eventos existentes entre o pico de LH e a ativação do MPF e da MAPK no oócito não são bem compreendidos. Alguns fatores foram identificados como possíveis reguladores da maturação nuclear. Fatores de crescimento semelhante ao EGF (*EGF-like grow factors*), como *Areg*, *Ereg* e *Btc* foram recentemente apontados como principais mediadores dos efeitos do LH sobre a expansão do cumulus, maturação de oócitos e ovulação (Park *et al.*, 2004; Romero e Smitz, 2010). Vaccari *et al.* (2009) demonstraram que GMPc e AMPc estão integrados e envolvidos no bloqueio da meiose em oócitos de camundongos através da regulação da PDE3. Em camundongos, Zhang *et al.* (2010) demonstraram que o peptídeo natriurético tipo C (CNP), produzido pelas células murais da granulosa, se liga ao receptor 2 (NPR-2) do cumulus e impede o reinício da meiose por inibir a PDE3 do oócito. Porém, a participação do CNP e os demais NPs na regulação da maturação nuclear de oócitos bovinos ainda não foi relatada.

2.2 Peptídeos Natriuréticos

Os Peptídeos Natriurético (NP) foram descobertos após observação que a infusão de extrato de tecido atrial em ratos provocava rápida diminuição da pressão arterial, vasodilatação, atividade natriurética (excreção aumentada de sódio na urina) e diurética (De Bold *et al.*, 1981). Após essas observações, purificou-se o peptídeo e foi demonstrado que ele também possuía capacidade de relaxar a musculatura lisa, passando a ser denominado NP atrial (ANP) (Flynn *et al.*, 1983). O peptídeo natriurético tipo-B (BNP), que inicialmente foi denominado peptídeo natriurético cerebral (Sudoh *et al.*, 1988), e o peptídeo natriurético tipo-C (CNP) (Sudoh *et al.*, 1990) foram purificados de extratos de cérebro suíno baseado na habilidade para relaxarem a musculatura lisa, porém também apresentam capacidade natriurética. O sistema dos NP consiste de três distintos peptídeos endógeno: ANP, BNP e CNP, além de três receptores localizados na superfície da célula alvo com um simples segmento trans-membrana (Gardner *et al.*, 2007): receptor NP-1 (NPR-1), NPR-2 e NPR-3 (Yasoda *et al.*, 2004; Potthast e Potter, 2005; Nishikimi *et al.*, 2011). Apesar do hormônio

precursor para cada um dos NPs ser codificado por um gene diferente, os NPs apresentam alta homologia, na qual possuem 17 aminoácidos (10 aminoácidos homólogos) em um anel com ligação dissulfeto, necessário para a atividade biológica (Nakao *et al.*, 1992; Potthast e Potter, 2005). Os NP são expressos nos tecidos como pré-pró-hormônios. O pré-pro-ANP possui 151 aminoácidos, sendo clivado para pro-ANP com 126 aminoácidos (Nakao *et al.*, 1992) e armazenado em grânulos atriais, sendo que esse é clivado pela enzima corin para formar o peptídeo ativo com 28 aminoácidos (ANP-28) (Yan *et al.*, 2000). O pré-pró-BNP humano é sintetizado com 134 aminoácidos, sendo clivado à 108 aminoácidos formando pró-hormônio, e por fim uma nova clivagem origina o peptídeo ativo com 32 aminoácidos (BNP-32) (Potter *et al.*, 2006). O pré-pró-CNP é sintetizado com 126 aminoácidos, com a clivagem de 23 aminoácidos forma o pró-CNP (103 aminoácidos) (Tawaragi *et al.*, 1991), e esse é processado pela endoprotease furin formando o peptídeo ativo com 53 aminoácidos (CNP-53) (Wu *et al.*, 2003). Em alguns tecidos, CNP-53 é clivado formando outro peptídeo ativo com 22 aminoácidos (CNP-22) por uma protease ainda desconhecida (Potter *et al.*, 2006). CNP-53 e CNP-22 apresentam diferentes expressões nos tecidos, mas ativam igualmente o NPR-2 e desencadeiam funções semelhantes (Yeung *et al.*, 1996).

Os ANP e BNP são produzidos principalmente no átrio e no ventrículo cardíaco, respectivamente, influenciando diretamente a pressão e a homeostase dos fluidos corporais (Matsukawa *et al.*, 1999). CNP, em contraste ao ANP e BNP que atuam como hormônios cardiovasculares, é expresso fortemente no cérebro, mas também em outros tecidos, apresentando níveis normalmente baixos na circulação. Dessa forma, acredita-se que o CNP apresente função autócrina ou parácrina, sendo comumente considerado um hormônio com propriedades anti-mitogênicas, regulador da ossificação endocondral (Matsukawa *et al.*, 1999) e com grandes evidências de estar envolvido em vários processos reprodutivos (Walther e Stepan, 2004).

Os NP exercem seus efeitos fisiológicos através da interação com receptores na célula-alvo. A ligação dos NP a dois de seus receptores (NPR-1 e NPR-2) ativa guanilatociclase, aumenta a concentração intracelular do segundo mensageiro guanilato monofosfato cíclico (GMPc), modulando a atividade biológica desses peptídeos (Kone, 2001). Por exemplo, regulam proteínas kinases dependentes de GMPc e específicas PDE (Potthast e Potter, 2005).

São conhecidos três receptores para os NP. Os três receptores apresentam um domínio de ligação extracelular (aproximadamente 450 aminoácidos) e uma simples região transmembrana hidrofóbica (Porter *et al.*, 1990; Gardner *et al.*, 2007). NPR-1 e NPR-2 apresentam domínio intracelular idêntico, consistindo de um domínio tipo kinase, um domínio de

dimerização e um domínio carboxi-terminal guanilatociclase, sendo a sinalização desses dois receptores através da síntese de GMPc. NPR-1 apresenta alta expressão nos rins, pulmões, adrenal, tecido vascular e adiposo (Lowe *et al.*, 1989), enquanto o NPR-2 apresenta alta expressão no cérebro, pulmões, rins, cartilagem e tecidos reprodutivos (Schulz *et al.*, 1989). NPR-3 contém um domínio intracelular com 37 aminoácidos e não tem atividade guanilatociclase, dessa forma, controlando as concentrações dos NP por internalizar e degradar o ligante (Levin *et al.*, 1998), também sendo conhecido como receptor de limpeza, e é amplamente expresso em diversos tecidos (Matsukawa *et al.*, 1999).

Os receptores NP apresentam especificidades diferentes para cada ligante. Segundo Suga *et al.* (1992), o NPR-1 apresenta afinidade pelo ANP maior ou igual ao BNP e pouca para CNP, já o NPR-2 possui afinidade pelo CNP muito maior que para o ANP, que apresenta maior ou igual afinidade por esse receptor quando comparado ao BNP. A afinidade do CNP pelo NPR-B é 50 e 500 vezes maior que o ANP e o BNP, respectivamente (Koller *et al.*, 1991). O NPR-3 apresenta afinidade pelo ANP maior que para o CNP, que possui maior ou igual afinidade para o BNP (Suga *et al.*, 1992), de modo que em camundongos *knockout* para o NPR-3 a meia vida plasmática do ANP aumenta (Matsukawa *et al.*, 1999).

Dentre os NPs, o CNP atuando via NPR-2 apresenta numerosas evidências de participação durante os processos reprodutivos em roedores. Sato *et al.* (2012), demonstraram que o CNP estimula o desenvolvimento folicular, além disso, Jankowski *et al.* (1997) e Noubani *et al.* (2000), observaram que CNP, NPR-1 e NPR-2 apresentaram variações durante o ciclo estral, possuindo máxima expressão no pró-estro. Gutkowska *et al.* (1999) demonstraram que o sistema NP no ovário de ratas é regulado por gonadotrofinas, especialmente FSH, e que CNP e NPR-2 aparecem como um importante sistema de regulação intraovariano. Em camundongos adultos, a expressão de CNP é destacada no tecido uterino e nos ovários (Stepan *et al.*, 2000). Nessa mesma espécie, o estradiol induz a expressão gênica de CNP no útero (Acuff *et al.*, 1997). Camundongos *knockout* para NPR-2 com 90 dias de vida não apresentavam corpo lúteo no ovário, e não possuem indícios de ciclo estral com base nos achados de citologia vaginal (Tamura *et al.*, 2004). Em ratos a expressão de CNP e NPR-2, no ovário e útero, é modulada durante o ciclo estral, com máxima expressão no pró-estro (Dos Reis *et al.*, 1995). Em camundongos, Zhang *et al.* (2010) demonstraram que o CNP, produzido pelas células murais da granulosa, se liga ao NPR-2 do cumulus e impede o reinício da meiose por inibir a PDE3 do oócito. Em suínos, recentemente, foi observado função semelhante para o CNP (Hiradate *et al.*, 2013). Da mesma forma, em espécies multiovular, foi demonstrado que CNP estimula o crescimento de folículos pré-antrais e antrais

(Sato *et al.*, 2012), e também é essencial para manter a meiose bloqueada em folículos iniciando a formação do antro (Tsuji *et al.*, 2012). Com o crescimento folicular, a expressão de CNP também é aumentada, atingindo os níveis mais elevados concomitantemente com o pico pré-ovulatório do LH (Kawamura *et al.*, 2011), estimulando a produção de Areg, os quais inibem a expressão de CNP, chegando aos níveis basais para que ocorra o reinício da meiose (Tsuji *et al.*, 2012)

3 CAPÍTULO 1

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

Natriuretic Peptides Stimulates Oocyte Meiotic Resumption in Cattle

**Matheus Pedrotti De Cesaro, Mariana Priotto de Macedo, Charles Alencar
Ludke, Joabel Tonello dos Santos, Vitor Braga Rissi, Paulo Roberto
Antunes da Rosa, Werner Giehl Glanzner, Bernardo Garziera Gasperin,
João Francisco Coelho de Oliveira, Paulo Bayard Dias Gonçalves**

THERIOGENOLOGY, 2013

Natriuretic Peptides Stimulates Meiotic Resumption of Bovine Oocytes

**Matheus Pedrotti De Cesaro^a, Mariana Priotto de Macedo^a, Charles Alencar Ludke^a,
Joabel Tonellotto dos Santos^a, Vitor Braga Rissi^a, Paulo Roberto Antunes da Rosa^a,
Werner Giehl Glanzner^a, Bernardo Garziera Gasperin^a, João Francisco Coelho de
Oliveira^a, Paulo Bayard Dias Gonçalves^{a,*}**

^aLaboratory of Biotechnology and Animal Reproduction – BioRep, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

Corresponding author and reprint requests:

Paulo Bayard Dias Gonçalves

e-mail: bayard@biorep.ufsm.br

Address: Universidade Federal de Santa Maria

Avenida Roraima, nº 1000, Prédio 97, sala 416.

Postal code 97105-900

Santa Maria, RS, Brazil

Tel: +55 (55) 32208752

Abstract

The aim of the present study was to characterize the natriuretic peptides (NP) system in cumulus-oocyte complex (COCs) and to demonstrate its role in the oocyte meiotic resumption in cattle. Initially, we observed the presence of mRNA for the type-A NP (ANP), CNP, natriuretic peptide receptor 1 (NPR-1), NPR-2 and NPR-3 in cumulus cells, whereas NPR-2 mRNA was solely detected in the bovine oocyte. Unlike mouse, neither one alone nor the combination of two or three NPs was able to prevent the meiosis resumption in cattle. Using an *in vitro* model, forskolin-arrested cattle oocyte resumed meiosis after 12 h of culture in the presence of ANP, BNP and/or CNP. Then, we characterized, for the first time, the mRNA expression and functional activities of the natriuretic peptide system in the oocyte meiotic resumption in a monovular species, using cattle as the animal model.

Key words: Monovular species, germinal vesicle breakdown, meiotic resumption, forskolin, cattle.

1. Introduction

The oocytes are extremely influenced by the LH preovulatory, which triggers the resumption of meiosis blocked since fetal life. However, the absence of this gonadotropin receptors in cumulus-oocyte complex (COCs) [1] suggests that the LH does not act directly on the female gamete, but stimulating intrafollicular mediators such *EGF-like growth factors* [2], that act of paracrine way.

The natriuretic peptides (NP) system, which consists of three endogenous peptides with high homology: type-A NP (ANP), type-B (BNP) and type-C (CNP) and three receptors (NPR-1, 2 and 3) located on the target cell surface [3-5], is mainly studied in the circulatory

system. However, the NPs and their receptors are critical for female reproductive organ development [6]. The ANP and BNP have a higher affinity for NPR-1 [7], whereas NPR-2 is selective for CNP [8]. These two receptors are membrane-bound guanylate cyclase, stimulating the synthesis of cGMP [9]. NPR-3 has no guanylate cyclase activity, and is responsible for internalization and degradation of the ligand [10-12].

In rodents, CNP, NPR-1 and NPR-2 are modulated by the estrous cycle, having the maximum expression in the proestrus, and stimulate follicular development [13-15]. CNP, produced by mural granulosa cells in mice, binds to the NPR-2 in cumulus cells, stimulating cGMP, which inhibits phosphodiesterase 3 (PDE3) in the oocyte and prevents cAMP degradation, inhibiting the oocyte meiotic resumption [16]. In addition, oocyte-derived paracrine factors and estradiol promote NPR-2 mRNA expression and maintains the function of this receptor in the cumulus cells [16, 17]. In swine, recently been shown that the CNP also inhibits meiosis resumption and the oocyte-derived paracrine factors participate in the regulation of cumulus NPR2 [18]. On the contrary, the preovulatory LH surge reduces the secretion of CNP [19] and NPR-2 activity in the follicle to induce the resumption of meiosis [20]. However, there is no knowledge about the role of this system in controlling meiosis in monovular species.

Our group demonstrated that in bovine follicle, angiotensin II (Ang II), acting through type-2 receptor (AGTR2), is essential in the early stages of the ovulatory process [21] and stimulates the meiosis resumption in cattle [22-24]. In the circulatory system, Ang II through AGTR2 and NP have identical functions [25], suggesting that the NP in bovine follicular environment may present functions contrary to those observed in mice. Thereby, we have as aims characterize the system natriuretic peptides in COCs and demonstrate its role in meiosis resumption in cattle.

2. Materials and Methods

All experimental procedures were reviewed and approved by the Federal University of Santa Maria Animal Care and Use Committee (23081.013597/2011–66 CCR/UFSM). All chemicals used were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA) and Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), unless otherwise indicated in the text.

2.1. Oocyte recovery and nuclear maturation

Bovine ovaries at various stages of the estrous cycle were obtained from an abattoir and transported to the laboratory in saline solution (0.9% NaCl) at 30 °C, containing 100 IU ml⁻¹ penicillin and 50 µg ml⁻¹ streptomycin sulfate. The COCs were aspirated from follicles 2 to 8 mm in diameter. Under a stereomicroscope were recovered and selected only COCs grade 1 and 2 according to Leibfried and First [26]. After selection, COCs were washed three times in TCM-199, containing Earle's salts and L-glutamine (Gibco Labs. Grand Island, NY, USA), supplemented with 25 mM Hepes, 0.2 mM pyruvic acid, 0.4% bovine serum albumin fatty acid-free (BSA), 100 IU ml⁻¹ penicillin and 50 µg ml⁻¹ streptomycin (TCM wash). Subsequently, the COCs were transferred to four-well culture dishes (Nunc[®], Roskilde, Denmark), containing 200 µl of maturation medium with the desired treatment. Then, the COCs were cultured at 39 °C, in a atmosphere containing 5% CO₂ in air and 95% relative humidity for 12 h, according to validated model (Fig. 1A). The culture medium consisted of basic TCM-199 with Earle's salts and L-glutamine (Gibco Labs. Grand Island, NY, USA), supplemented with 25 mM Hepes, 2.2 mg ml⁻¹ sodium bicarbonate, 0.2 mM pyruvic acid, 0.5 mg ml⁻¹ of FSH (Folltropin[®]-V, Bioniche, ON, CA), 100 IU ml⁻¹ penicillin, 50 µg ml⁻¹ streptomycin and 0.4% BSA.

2.2. Analysis of nuclear maturation

At the end of the culture period, cumulus cells of COCs were removed by repeated pipetting and denuded oocytes (DO) were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, followed by permeabilization of the nuclear membranes with 0.5% Triton X-100. For assessment of nuclear maturation, oocytes were exposed to 10 µg/ml of bisbenzimidazole (Hoescht 33342) for 15 min. Between slide and coverslip, stained oocytes were classified under UV light with a fluorescence microscope, according with characteristic of chromatin: germinal vesicle (GV), GV breakdown (GVBD) and metaphase I (MI). Oocytes that resumed meiosis (GVBD or MI) were described and statistically analysed as GVBD.

2.3. Nucleic acid extraction, RT-PCR and PCR

Immediately after selection, a group of the COCs had cumulus cells (CC) and the DO separated by vortexing for 5min. The CC were immediately stored in Trizol and the DO were exposed to 0.5% proteinase K until complete removal of the zona pellucida. Total RNA from a pool of COCs, DO and CC was extracted using Trizol according to the manufacturer's instructions. The total RNA was quantified by absorbance at 260 nm using a NanoDrop1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Purity was assessed through absorption ratio OD260/OD280 and samples with values below 1.8 were discharged.

Total RNA (1 µg) was first treated with 0.2 U DNase at 37 °C for 5 min to digest any contaminating DNA, followed by heating at 65 °C for 3 min. RNA was reverse-transcribed (RT) in the presence of 1 µM oligo (dT), 4 U Omniscript RTase (Omniscript RT Kit; Qiagen, Mississauga, ON, Canada), 0.5 mM dideoxynucleotide triphosphate (dNTP) mix, and 10 U

RNase Inhibitor in a volume of 20 μ L at 37 °C for 1 h. The reaction was ended by incubation at 93 °C for 5 min. The PCR was performed using StepOnePlus™ RT-PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) using Platinum SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) and specific primers listed in Table 1. All primers used were designed based on the sequences of Gen Bank using Primer Express Software v3.0 and synthesized by Invitrogen (Table 1). The dissociation curve was examined to verify the identity of the product. The integrity of the sample was assessed by amplification of GAPDH gene, and the contamination of DO with CC was assessed by amplification of CYP19 gene.

2.4. Experimental design

2.4.1. Expression of natriuretic peptide mRNA and their receptors in bovine COCs

This experiment was designed to assess the presence of mRNA for NPs and their receptors. COCs (200 structures), denuded oocytes (DO) and cumulus cells (CC) from follicles of 2 to 8 mm in diameter were subjected to RT-PCR. The products of reaction were submitted to gel electrophoresis in 2.5% agarose stained with ethidium bromide and observed under UV light.

2.4.2. Effect of natriuretic peptides in preventing the oocyte meiotic resumption in cattle

To evaluate the effect of NP in prevent the meiosis resumption on bovine oocyte, two experiments were performed. In both experiments, there were groups without treatment

(control group). In experiment 1, to evaluate the effect of NPs in prevent the meiosis resumption in dose-dependent manner bovine COCs were cultured in the presence of ANP, BNP and CNP, separately, on three different concentrations (10, 100 and 1000 nM). The second experiment was designed to evaluate whether the association of three NP (ANP, BNP and CNP) is effective in preventing the meiosis resumption. For this, COCs were cultured in the presence (n = 47) of 1000 nM of each NP or not (n = 50; control group). The experiments were performed in triplicate.

2.4.3. Effect of natriuretic peptides in stimulating the oocyte meiotic resumption in cattle

Four experiments were performed to evaluate the role of NPs on the bovine oocyte meiotic resumption. In all experiments, there were a positive control group (without both forskolin and treatment) and a negative control group (with 100 μ M forskolin) to evaluate the oocyte maturation system and the inhibition of meiotic resumption, respectively. In experiment 1, the effect of ANP and CNP on oocyte meiotic resumption was tested in a dose-dependent manner at concentrations of 10, 100 or 1000 nM. Fifty COCs were cultured in each control (positive and negative) group and at least forty-seven in each concentration (10, 100 or 1000 nM) of ANP and CNP in the presence of forskolin (Total n = 408). In experiment 2, the hypothesis that ANP and CNP combined induce an increase in the percentage of oocytes that resume meiosis was tested. At least 158 COCs were cultured in the presence of ANP, CNP or ANP+CNP and 54 oocytes were used in each control group (Total n = 256). The third experiment was similar to the first experiment, except that BNP was tested in a dose dependent manner at concentrations of 10, 100 or 1000 nM to induce the meiotic resumption using 105 COCs in the control groups and at least 153 COCs in the treatment groups. Finally,

a fourth experiment was conducted to determine the requirement of combining different NPs to induce high rates of GVBD. At least 427 COCs were divided in eight groups (2 controls and 6 treatments). In the treatment groups, the COCs were cultured in the presence of forskolin and ANP, BNP, CNP, ANP+BNP, BNP+CNP or ANP+BNP+CNP. The experiment was conducted in three replicates and each group had at least 17 COCs in each replicate.

2.5. Statistical Analysis

The analyses were conducted in statistical analysis software (SAS; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA), considering each COC as an experimental unit. In the experiments of nuclear maturation, the proportion of GVBD in the different treatments was evaluated using a statistical model for categorical data (PROC CATMOD), and the difference between groups was compared by means of contrasts. All in vitro experiments were performed in triplicate. We used 5% significance.

3. Results

3.1. Expression of natriuretic peptide mRNA and their receptors in bovine COCs

Initially, we examined the presence of mRNA for natriuretic peptides and their receptor by RT-PCR in bovine COCs, DO and CC from follicles from 2 to 8 mm in diameter. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products revealed a single band consistent with ANP, CNP, NPR-1, NPR-2 and NPR-3 mRNA in cumulus cells. However, only mRNA for NPR-2 was observed in the oocyte (data not shown). These preliminary results and recent works

using mouse as a model, allowed us to hypothesize that the natriuretic peptide system has a role in the oocyte meiotic resumption in cattle.

3.2. Effect of natriuretic peptides in preventing the oocyte meiotic resumption in cattle

The presence of the three receptors for natriuretic peptides in cumulus cells suggests that the meiosis resumption in cattle is inhibited by the NPs, similarly to that observed in mice [16]. To test this hypothesis, two experiments were performed. In experiment 1, COCs were cultured in the presence of 10, 100 or 1000 nM of ANP, BNP or CNP or without NPs. The oocyte meiotic resumption was unaffected by the presence of NPs at different concentrations (Fig. 1B). Considering the difference in cattle and mouse oocyte and the presence of mRNA for ANP, CNP, NPR-1, -2 and -3 in cumulus cells, COCs were cultured in the presence of the three NPs combined at the highest concentration tested (1000 nM). Similarly to the first experiment, the NPs did not affect the resumption of meiosis in the presence of the combination of NPs in high concentrations (Fig. 1C).

3.3. Effect of natriuretic peptides in stimulating the oocyte meiotic resumption in cattle

Given the absence of effect in preventing the oocyte meiotic resumption in cattle, we conducted four experiments to assess whether NPs have a role in stimulating the oocyte meiotic resumption. The meiosis resumption was inhibited with 100 μ M forskolin. In all experiments, there were a positive control group (without forskolin) and a negative control group (with forskolin) to evaluate the oocyte maturation system and the inhibition of meiotic resumption, respectively. In the first experiment, the COCs were cultured in the presence of 10, 100 or 1000 nM of ANP or CNP. Oocytes were partially stimulated to undergo GVBD

when cultured in the presence of NPs, independent of the concentration used (Fig. 2A). All the positive control oocytes resumed meiosis whereas only 24% of the negative control oocytes underwent GVBD. When the oocytes were cultured in the presence of forskolin and different concentrations of NPs, rates from 44% to 73% of GVBD were observed (Fig. 2A). In the second experiment, the interaction of ANP and CNP on the oocyte meiotic resumption was evaluated. The rate of GVBD in the ANP+CNP (70%) was not different from those observed when COCs were incubated with ANP (63%) or CNP (57%). The resumption of meiosis was also partially stimulated by ANP+CNP when compared to positive and negative control group (Fig. 2B). Although the expression of BNP mRNA has not been observed in COCs, the BNP has great binding affinity for NPR-1. For this reason, we verified the effect of BNP at concentrations of 10, 100 or 1000 nM on oocyte meiotic resumption. In this experiment, the rates of GVBD were similar to that observed with ANP or CNP (Fig. 3A). Then, we investigated the interaction between all NPs to induce GVBD. The pattern of meiotic resumption was similar to the other experiments, in which each NP or their combinations induce partially the resumption of meiosis in cattle oocyte (Fig. 3B).

4. Discussion

In the present study, we characterized for the first time natriuretic peptide system in cumulus-oocyte complex; furthermore, we tested the hypothesis that ANP, BNP and CNP stimulate the meiosis resumption in bovine COCs. The main findings were 1) mRNA for ANP, CNP, NPR-1, NPR-2 and NPR-3 were present in cumulus cells and mRNA for NPR-2 in cattle oocyte; 2) Natriuretic peptides were not able to maintain meiotic arrest in cattle oocytes as observed in mouse; 3) ANP, BNP and CNP partially stimulated meiosis resumption inhibited by forskolin in bovine oocytes; and 4) The interaction of two or three

NPs did not increase the rate of meiosis resumption in cattle. These results, observed in a trust model (Fig. 1A), are contrary to those observed in mice treated with CNP, essential for maintaining oocyte meiotic arrest [16]. This study demonstrated that NPs stimulates the meiosis resumption in cattle oocyte arrested with forskolin.

Initially, we observed that mRNA for ANP, CNP and its receptors were present in CC and DO in cattle. Also, the three NP receptor mRNA expressions were observed in rat ovary homogenates [27]. In *knockout* mice for NPs and its receptors, growth of the female reproductive system and fertility were affected [6]. In mice, the maximum expression of CNP mRNA and protein was observed near the LH surge [14, 19], which bound to NPR-2 in cumulus cells, increasing cGMP-inhibited phosphodiesterases (PDEs) to maintain elevated levels of cAMP in the oocyte, which prevents the meiosis resumption [16]. Moreover, it was observed that ANP and BNP were not able to maintain mouse oocyte in meiotic arrest [16]. In rats, the ANP inhibited the resumption of meiosis [28]. Given these results in rodents and the initial characterization of NP system in cumulus cells and oocyte, our hypothesis was that the mechanism of meiotic arrest would be similar in rodents and cattle. However, contrary to our hypothesis, the three NPs alone (Fig. 1B) or in combinations (Fig. 1C) were not able to maintain the cattle oocytes in meiotic arrest. Moreover, they stimulated the resumption of meiosis in oocyte meiotically arrested by forskolin (Fig. 2 and 3).

We detected ANP and CNP, but not BNP, mRNA in mural granulosa cells in cattle (unpublished data). These finds allow us to speculate that ANP and CNP from mural granulosa and cumulus cells, induced by LH surge, are required to induce meiotic resumption in cattle oocyte. Unlike what occurs in mice [16] and porcine [18, 29], we demonstrate evidence that cGMP stimulates PDE activity in cattle oocytes, inducing GVBD.

In summary, we demonstrated for the first time the natriuretic peptide system in cumulus-oocyte complex. In functional studies, we demonstrated that NPs were not able to

maintain meiotic arrest in cattle oocytes as observed in mouse but they partially stimulated meiosis resumption inhibited by forskolin in monovular species.

5. Acknowledgments

We would like to thank CAPES and CNPq for the financial support and Silva's abattoir for providing the ovaries.

6. References

- [1] Peng XR, Hsueh AJ, LaPolt PS, Bjersing L, Ny T. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology*. 1991;129:3200-7.
- [2] Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*. 2004;303:682-4.
- [3] Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev*. 2006;27:47-72.
- [4] Gardner DG, Chen S, Glenn DJ, Grigsby CL. Molecular biology of the natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension. *Hypertension*. 2007;49:419-26.
- [5] Misono KS, Philo JS, Arakawa T, Ogata CM, Qiu Y, Ogawa H, et al. Structure, signaling mechanism and regulation of the natriuretic peptide receptor guanylate cyclase. *FEBS J*. 2011;278:1818-29.
- [6] Tamura N, Doolittle LK, Hammer RE, Shelton JM, Richardson JA, Garbers DL. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:17300-5.
- [7] Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, et al. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology*. 1992;130:229-39.
- [8] Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, et al. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science*. 1991;252:120-3.
- [9] Kone BC. Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*. 2001;51:429-41.
- [10] Maack T, Suzuki M, Almeida FA, Nussenzweig D, Scarborough RM, McEnroe GA, et al. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science*. 1987;238:675-8.
- [11] Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med*. 1998;339:321-8.
- [12] Potter LR. Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation. *FEBS J*. 2011;278:1808-17.

- [13] Sato Y, Cheng Y, Kawamura K, Takae S, Hsueh AJ. C-Type Natriuretic Peptide Stimulates Ovarian Follicle Development. *Mol Endocrinol*. 2012.
- [14] Jankowski M, Reis AM, Mukaddam-Daher S, Dam TV, Farookhi R, Gutkowska J. C-type natriuretic peptide and the guanylyl cyclase receptors in the rat ovary are modulated by the estrous cycle. *Biol Reprod*. 1997;56:59-66.
- [15] Noubani A, Farookhi R, Gutkowska J. B-type natriuretic peptide receptor expression and activity are hormonally regulated in rat ovarian cells. *Endocrinology*. 2000;141:551-9.
- [16] Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Xia G, Eppig JJ. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science*. 2010;330:366-9.
- [17] Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, Xia G, Eppig JJ. Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. *Endocrinology*. 2011;152:4377-85.
- [18] Hiradate Y, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. C-type natriuretic peptide inhibits porcine oocyte meiotic resumption. *Zygote*. 2013:1-6.
- [19] Kawamura K, Cheng Y, Kawamura N, Takae S, Okada A, Kawagoe Y, et al. Pre-ovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes. *Hum Reprod*. 2011;26:3094-101.
- [20] Robinson JW, Zhang M, Shuhaibar LC, Norris RP, Geerts A, Wunder F, et al. Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes. *Dev Biol*. 2012;366:308-16.
- [21] Ferreira R, Oliveira JF, Fernandes R, Moraes JF, Goncalves PB. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. *Reproduction*. 2007;134:713-9.
- [22] Giometti IC, Bertagnolli AC, Ornes RC, da Costa LF, Carambula SF, Reis AM, et al. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. *Theriogenology*. 2005;63:1014-25.
- [23] Stefanello JR, Barreta MH, Porciuncula PM, Arruda JN, Oliveira JF, Oliveira MA, et al. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology*. 2006;66:2068-76.
- [24] Barreta MH, Oliveira JF, Ferreira R, Antoniazzi AQ, Gasperin BG, Sandri LR, et al. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E2 and F2alpha. *Reproduction*. 2008;136:733-40.
- [25] Paulis L, Unger T. Novel therapeutic targets for hypertension. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7:431-41.
- [26] Leibfried L, First NL. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci*. 1979;48:76-86.
- [27] Nagase M, Katafuchi T, Hirose S, Fujita T. Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1997;15:1235-43.
- [28] Tornell J, Carlsson B, Billig H. Atrial natriuretic peptide inhibits spontaneous rat oocyte maturation. *Endocrinology*. 1990;126:1504-8.
- [29] Zaffalon FG, Guimmelette C, Leal CL, Richard FJ. 268 cyclic guanosine monophosphate inhibits phosphodiesterase 3 activity in porcine oocytes. *Reproduction, fertility, and development*. 2012;25:282.

Table 1 - Primers used in the expression analysis for system natriuretic peptide characterization experiment.

Gene		Sequence	Reference or accession no.
ANP	F	GGAGCAAATCCCGTGTATGG	NM_174124.1
	R	CCTCATCTTCTAAAGGCATCTTGTC	
BNP	F	GCAACGTGCTGAGGAGGTACT	NM_001166570.1
	R	GAGAAGAACCATCTTATATAAAACAACCAA	
CNP	F	CAACGCGCGCAAATACAA	NM_174125.2
	R	TCAGCAAAACGCAGCAAGTC	
NPR-1	F	AATTATGGCTCCCTACTAACCACAGA	ENSBTAT00000008184
	R	TCCGGTTCACACGTTTCACA	
NPR-2	F	TCTGCTCCTAAGCTGGGTGAGT	ENSBTAT00000015204 / NM_174126
	R	CGGTCATCTGTGCGAGCAT	
NPR-3	F	TTTGAAGCTAAGCAAGCGTACTCA	NM_174127.2
	R	CAGAACTTTTCACCTCCATGGAA	
GAPDH	F	GATTGTCAGCAATGCCTCCT	
	R	GGTCATAAGTCCCTCCACGA	
CYP19	F	GTGTCCGAAGTTGTGCCTATT	(Luo e Wiltbank, 2006)
	R	GGAACCTGCAGTGGGAAATGA	

Figure legends

Figure 1. Effect of ANP, BNP and CNP in preventing the oocyte meiotic resumption in cattle. (A) Percentage of GV oocytes arrested during 12 hours of *in vitro* maturation. (B) The rate of GVBD after 12 hours of *in vitro* maturation in the presence of ANP, BNP or CNP at different concentrations (10, 100 and 1000 nM). (C) The rate of GVBD after 12 hours of *in vitro* maturation in the presence of 1000 nM of ANP, BNP and CNP combined. The experiments were performed in triplicate.

Figure 2. Effect of the ANP and/or CNP on meiotic resumption in bovine oocytes inhibited by forskolin (100 μ M). (A) Dose-response effect (10, 100 and 1000 nM) of ANP and CNP. (B) Effect of the combination of ANP (1000 nM) and CNP (1000 nM) in stimulating resumption of meiosis. The experiments were performed in triplicate. Different letters indicate statistical significance ($P \leq 0.05$) between groups.

Figure 3. Effect of BNP and its combinations with ANP and CNP in stimulating meiotic resumption in bovine oocytes inhibited with forskolin (100 μ M). (A) Dose-response effect (10, 100 and 1000 nM) of BNP. (B) Combination of ANP (1000 nM), BNP (10 nM) and CNP (1000 nM) in stimulating the resumption of meiosis. The experiments were performed in triplicate. Different letters indicate statistical significance ($P \leq 0.05$) between groups.

Figure 1.

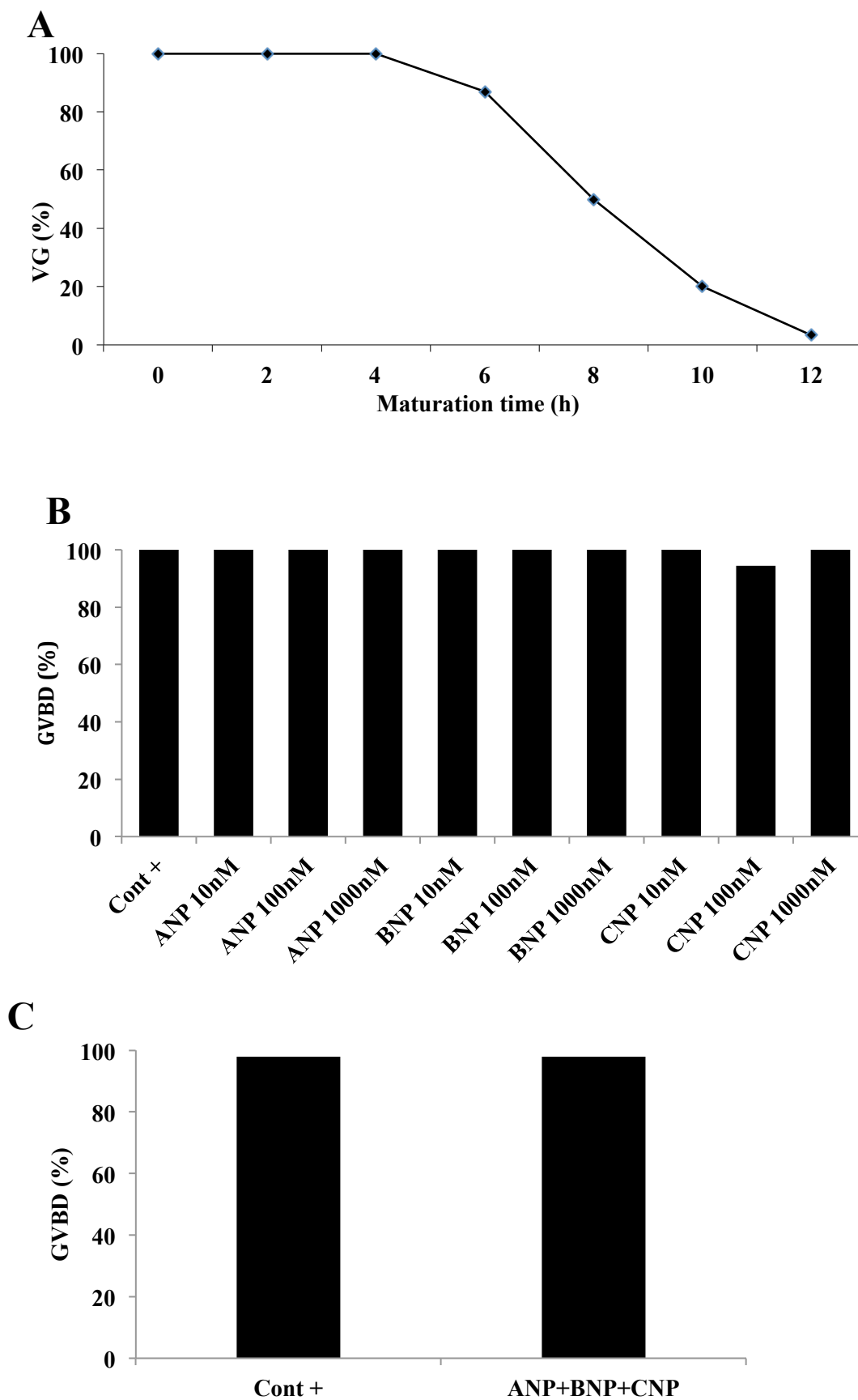


Figure 2.

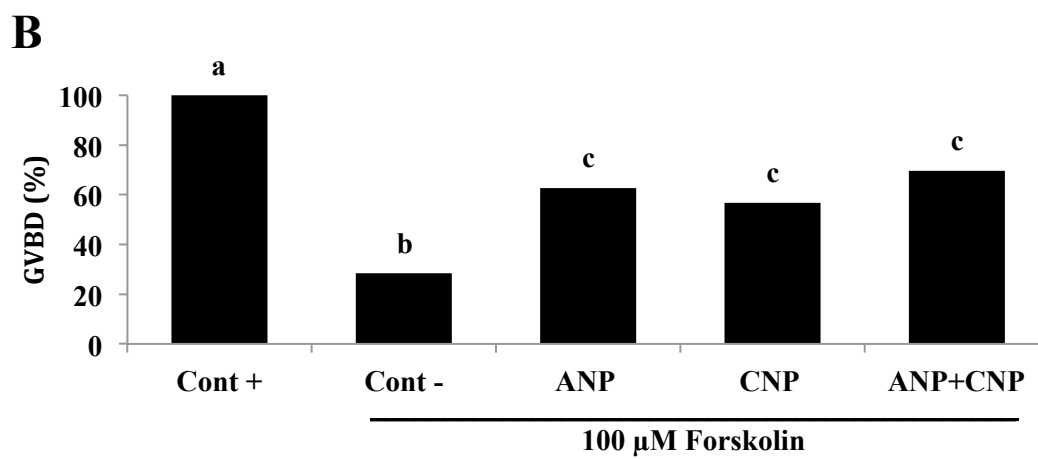
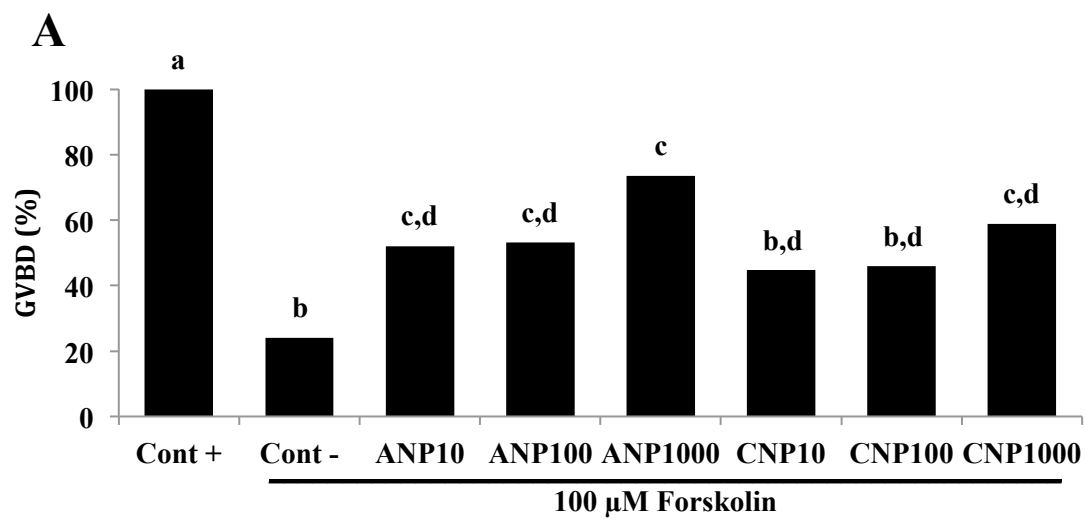
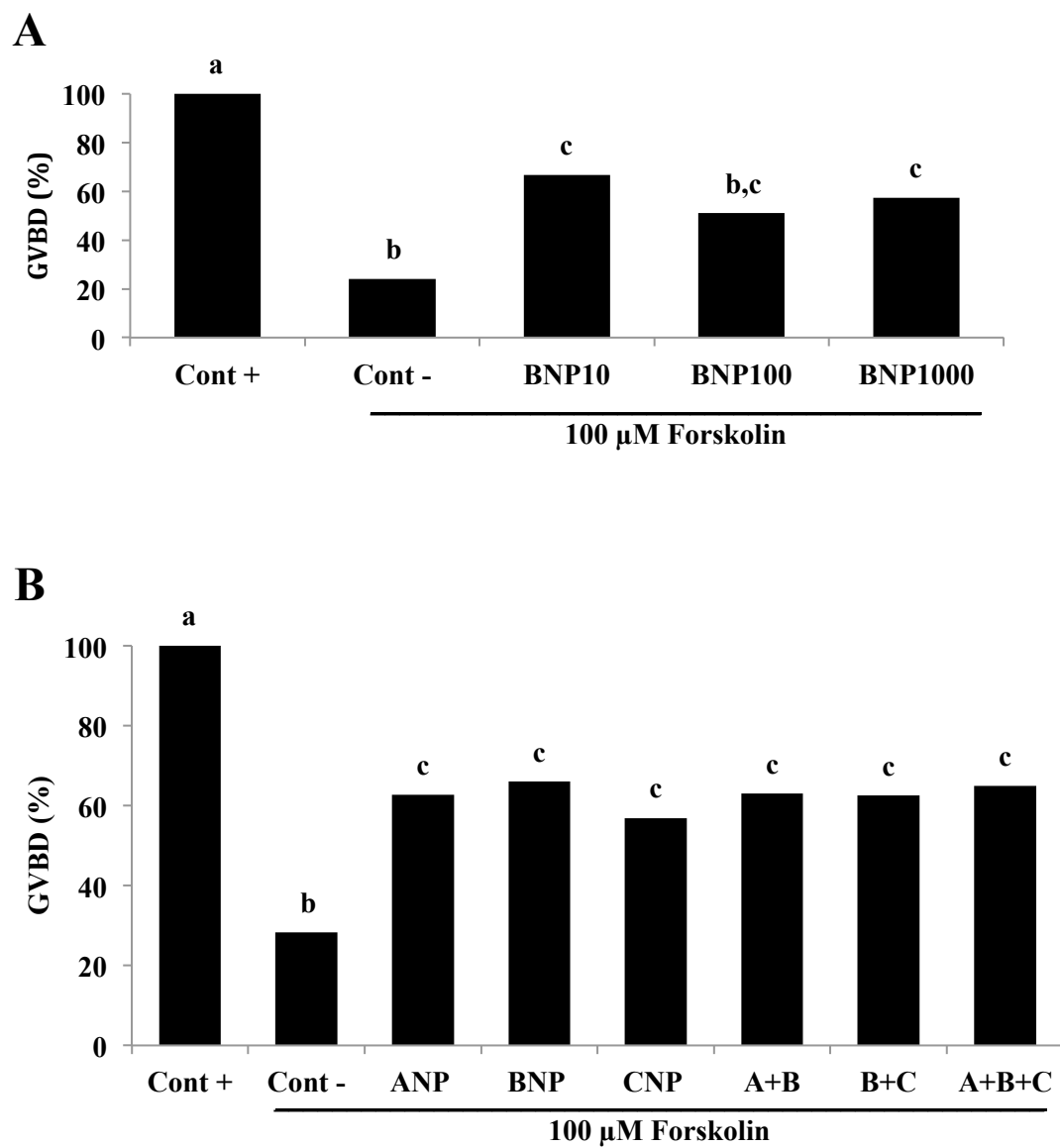


Figure 3.



4 CAPÍTULO 2

REVISÃO A SER ENVIADA PARA PUBLICAÇÃO:

**RECENTES AVANÇOS NO ENTENDIMENTO DO REINÍCIO DA
MEIOSE EM OÓCITOS MAMÍFEROS: PARTICIPAÇÃO DOS
PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS**

**Matheus Pedrotti De Cesaro, Joabel Tonello dos Santos, Paulo Roberto
Antunes da Rosa, Werner Giehl Glanzner, Vitor Braga Rissi, Bernardo
Garziera Gasperin, João Francisco Coelho de Oliveira, Paulo Bayard Dias
Gonçalves**

Recentes avanços no entendimento do reinício da meiose em oócitos mamíferos:

participação dos peptídeos natriuréticos

Recent advances in understanding the meiosis resumption in oocyte mammals:

involvement of natriuretic peptides

Matheus Pedrotti De Cesaro¹ Joabel Tonellotto dos Santos¹ Paulo Roberto Antunes da

Rosa¹ Werner Giehl Glanzner¹ Vitor Braga Rissi¹ Bernardo Garziera Gasperin¹ João

Francisco Coelho de Oliveira¹ Paulo Bayard Dias Gonçalves^{1,*}

-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-

RESUMO

As fêmeas domésticas contém centenas de gametas no estágio de diplóteno da primeira prófase meiótica no ovário ao longo de sua vida. As biotécnicas direcionadas a multiplicação de fêmeas de elevado valor econômico tem como foco principal a utilização desses gametas de uma maneira mais eficiente do que a fisiológica. Por outro lado, métodos eficazes para o controle da ovulação em humanos e animais de estimação têm apresentado uma demanda social relevante. Para isso, o entendimento dos processos complexos de reinício da meiose e de maturação do oócito é imperativo. Recentemente estudos têm contribuído para esclarecer alguns destes mecanismos, os quais têm derrubado antigos dogmas e evidenciado modelos fisiológicos importantes para o desenvolvimento de novas biotecnologias de controle do ciclo estral e ovulação. No entanto, apesar dessa importância, não há uma discussão dos resultados obtidos desses experimentos que tentam explicar esses processos fisiológicos. O objetivo desta revisão é compilar, os achados científicos passados do reinício da meiose e maturação de oócitos e também os recentes estudos a cerca da atuação dos peptídeos natriuréticos nesse evento.

Palavras-chave: retomada da meiose, maturação de oócito, peptídeo natriurético, fosfodiesterase.

ABSTRACT

Domestic females contain hundreds of gametes in the diplotene stage of the first prophase meiotic in the ovary throughout their life. The biotechnologies aim to multiply of female with high economic value has mainly focused on the use of these gametes of a more efficient way than the physiological. On the other hand, effective methods to control ovulation in humans and animals have been a relevant social demand. For this, the understanding of the complex processes of meiosis resumption and oocyte maturation is required. Recent studies have contributed to clarify some of these mechanisms, which have put down old dogmas and demonstrated physiological models important for the development of new biotechnologies such as control of the estrus cycle and ovulation. However, despite this importance, there is no discussion of the results of these experiments that attempt to explain these physiological processes. The aim of this review is to compile the scientific findings of the well established past meiosis resumption and oocyte maturation processes and also the recent studies about the role of natriuretic peptides in this event.

Key words: meiotic reumption, oocyte maturation, natriuretic peptide, phosphodiesterase.

INTRODUÇÃO

Os oócitos são derivados das células germinativas primordiais, as quais, ainda no desenvolvimento fetal, transformam-se em oogônias que podem chegar a 2.700.000 no dia 110 de gestação em bovinos, entretanto, aproximadamente 95% dos oócitos são perdidos até o nascimento (ERICKSON, 1966). Segundo MOTTA et al. (1997), muitos oócitos sofrem processos degenerativos como resultados de erros genéticos ocorridos durante o “*crossing*

over” ou devido a distúrbios metabólicos e/ou vasculares. Na fêmea bovina, em torno dos 72-82 dias de gestação, alguns oócitos já iniciam a primeira prófase meiótica, passando então pelos estádios de leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno, na qual ocorre o primeiro bloqueio da meiose, também denominado estágio de dictióteno da prófase I ou de vesícula germinativa (VG; RICHARDS, 1980).

Em muitas espécies de mamíferos, o início da meiose acontece durante a vida fetal, na qual o oócito permanece no estágio de VG até o folículo se tornar atrésico ou se desenvolver e ser capaz de induzir a ovulação (SIRARD et al., 1989) pela estimulação do pico ovulatório do Hormônio Luteinizante (LH). A maturação do oócito tem por objetivo formar uma célula haplóide (bloqueada em metáfase II - MII), apta a ser fecundada, e que tenha capacidade para suportar os primeiros estádios de desenvolvimento embrionário, até a ativação do seu genoma. Na presente revisão, o foco é destacar os achados científicos no que diz respeito ao reinício da meiose e maturação de oócitos, que são os gargalos para a produção *in vitro*, e também as recentes descobertas a cerca da atuação dos peptídeos natriuréticos nesse evento.

Reinício da meiose

Os oócitos bovinos adquirem progressivamente a competência meiótica (capacidade de reiniciarem a meiose), a qual é plena em oócitos com tamanho em torno de 110 - 115µm inclusos em folículos com 2-3 mm de diâmetro (FAIR et al., 1995; OTOI et al., 1997). *In vivo*, o reinício da divisão meiótica ocorre somente em oócitos inclusos em folículos pré-ovulatórios e competentes, em resposta ao surgimento do LH ovulatório. Porém, *in vitro*, esse processo é desencadeado independentemente de hormônios, simplesmente pela remoção do oócito competente do ambiente folicular (PINCUS & ENZMANN, 1935). 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 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).

O reinício da meiose, tanto *in vivo* como *in vitro*, inicia pela dissolução da membrana nuclear e condensação da cromatina no processo denominado de *germinal vesicle Breakdown* (GVBD), progredindo sucessivamente para os estádios de metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI) e MII, na qual ocorre o segundo bloqueio da meiose (SIRARD et al., 1989). O tempo requerido para a maturação nuclear varia entre as espécies. No bovino, a GVBD 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 após a remoção do oócito do ambiente folicular (SIRARD et al., 1989; WU et al., 1997).

A regulação da meiose é extremamente complexa, incluindo eventos de fosforilação e de desfosforilação. O armazenamento de RNAm, através do encurtamento da cauda poli-A, principalmente para o fator promotor da maturação (MPF) é necessário para conferir competência para o oócito. O MPF é uma proteína de 79kD composta por uma subunidade catalítica (34kD), conhecida como p34Cdc2 kinase, e uma subunidade regulatória (45kD), conhecida como ciclina B (GAUTIER et al., 1990). Para a ativação do MPF, a treonina-14 e a tirosina-15 da subunidade catalítica devem ser desfosforiladas pela enzima Cdc25 fosfatase (KUMAGAI & DUNPHY, 1992). Os oócitos em fase de crescimento têm níveis baixos de p34Cdc2 e não progridem da fase G2 (intervalo entre síntese de DNA e divisão celular) para a fase M (divisão celular, meiose), entretanto, no final da fase de crescimento há um grande aumento na concentração e atividade da p34Cdc2 para a aquisição da competência meiótica (CHESNEL & EPPIG, 1995; DE VANTERY et al., 1996). Durante a GVBD, os níveis de MPF estão baixos, tendo um aumento gradual até atingir níveis máximos no estádio 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 & YANG, 1999).

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 por sinal extracelular-1 (ERK1) e ERK2, sendo a última isoforma mais abundantemente expressa em oócitos (TROUNSON et al., 2001). O momento da ativação da MAPK varia nas diferentes espécies, de modo que é ativada em consequência da fosforilação de uma tirosina e uma treonina durante a maturação do oócito (KOSAKO et al., 1994). Nos bovinos, a MAPK é ativada na VGBD, tendo sua atividade máxima em MI e 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).

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 pelas mesmas (SIRARD & FIRST, 1988; RICHARD & SIRARD, 1996; GIOMETTI et al., 2005; BARRETA et al., 2008).

Adenosina monofosfato cíclica (AMPc)

A adenosina monofosfato cíclica (AMPc) tem sua concentração aumentada em função do estímulo de LH no foliculo. Entretanto, níveis altos de AMPc dentro do oócito impedem o reinício da meiose (THOMAS et al., 2002) em diversas espécies. Uma hipótese para explicar isso, propõem que AMPc é compartimentalizado dentro do foliculo ovariano, sendo diferentemente regulado dentro do oócito (célula germinativa) e nas células somáticas (células

da teca, granulosa e cumulus), devido a diferentes localizações de fosfodienterasas (PDE) (TSAFRIRI et al., 1996). Os níveis de AMPc presentes nas células do cumulus e no oócito são dependentes da síntese por adenilato ciclase e da degradação por PDE. A principal enzima envolvida na degradação do AMPc no interior do oócito é a PDE3, independente da espécie, entretanto, nas células do cumulus, que também influenciam os níveis de AMPc no interior do oócito via comunicação intercelular pelas junções tipo *gap*, a PDE4 é a mais abundante para roedores (CONTI et al., 2002) e a PDE8 para bovinos (SASSEVILLE et al., 2009). O cultivo *in vitro* de complexos cumulus-oócito (CCOs) bovinos na presença de um inibidor da PDE3 atrasa o reinício da meiose (BILODEAU-GOESEELS, 2003), contudo, em CCOs de camundongo a meiose é totalmente bloqueada (ROMERO & SMITZ, 2010). De maneira semelhante, VACCARI et al. (2009) demonstraram que GMPc e AMPc estão integrados e envolvidos no bloqueio da meiose em oócitos de camundongos através da regulação da PDE3.

A regulação dos eventos responsáveis pela retomada da divisão meiótica e completa maturação do oócito ainda não foram completamente elucidados. *In vivo*, provavelmente o pico de LH seja um sinal comum para ativar o MPF e a MAPK promovendo a maturação dos oócitos (DEKEL, 1996). Porém, a ausência de receptores de LH no oócito e no cumulus (PENG et al., 1991) sugere que essa gonadotrofina não atue diretamente no gameta feminino, mas sim estimulando a produção de fatores intrafoliculares que induzem a GVBD. Fatores de crescimento semelhante ao EGF (*EGF-like growth factors*), como a anfiregulina, epiregulina e betacelulina foram recentemente apontados como principais mediadores dos efeitos do LH sobre a expansão do cumulus, maturação de oócitos e ovulação (PARK et al., 2004; ROMERO & SMITZ, 2010).

Peptídeos Natriurético

Os Peptídeos Natriurético (NP) foram descobertos após observação que a infusão de extrato de tecido arterial em ratos provocava rápida diminuição da pressão arterial, vasodilatação, atividade natriurética (excreção aumentada de sódio na urina) e diurética (DE BOLD et al., 1981). Após essas observações, purificou-se o peptídeo e foi demonstrado que ele também possuía capacidade de relaxar a musculatura lisa, passando a ser denominado NP atrial (ANP) (FLYNN et al., 1983). O peptídeo natriurético tipo-B (BNP), que inicialmente foi denominado peptídeo natriurético cerebral (SUDOH et al., 1988), e o peptídeo natriurético tipo-C (CNP) (SUDOH et al., 1990) foram purificados de extratos de cérebro suíno baseado na habilidade para relaxarem a musculatura lisa, porém também apresentam capacidade natriurética. O sistema dos NP consiste de três distintos peptídeos endógeno: ANP, BNP e CNP, além de três receptores localizados na superfície da célula alvo com um simples segmento trans-membrana (GARDNER et al., 2007): receptor NP-1 (NPR-1 ou NPR-A ou guanilil ciclase-A – CG-A), NPR-2 (NPR-B ou CG-B) e NPR-3 (NPR-C ou CG-C) (YASODA et al., 2004; POTTHAST & POTTER, 2005; NISHIKIMI et al., 2011).

Síntese dos peptídeos natriuréticos

Apesar do hormônio precursor para cada um dos NP ser codificado por um gene diferente, os NP apresentam alta homologia, na qual possuem 17 aminoácidos (10 aminoácidos homólogos) em um anel com ligação dissulfeto, necessário para a atividade biológica (POTTHAST & POTTER, 2005; POTTER et al., 2006; NAKAO et al., 1992). Os NP são expressos nos tecidos como pré-pró-hormônio. O pré-pro-ANP possui 151 aminoácidos, sendo clivado para pró-ANP com 126 aminoácidos (NAKAO et al., 1992) e armazenado em grânulos atriais, sendo que esse é clivado pela enzima corin para formar o peptídeo ativo com 28 aminoácidos (ANP-28) (YAN et al., 2000). O pré-pró-BNP humano é sintetizado com 134 aminoácidos, sendo clivado à 108 aminoácidos formando pró-hormônio, e por fim uma nova clivagem origina o peptídeo ativo com 32 aminoácidos (BNP-32)

(POTTER et al., 2006). O pré-pró-CNP é sintetizado com 126 aminoácidos, com a clivagem de 23 aminoácidos forma o pró-CNP (103 aminoácidos) (TAWARAGI et al., 1991), e esse é processado pela endoprotease furin formando o peptídeo ativo com 53 aminoácidos (CNP-53) (WU et al., 2003). Em alguns tecidos, CNP-53 é clivado formando outro peptídeo ativo com 22 aminoácidos (CNP-22) por uma protease ainda desconhecida (POTTER et al., 2006). CNP-53 e CNP-22 apresentam diferentes expressões nos tecidos, mas ativam igualmente o NPR-B e desencadeiam funções semelhantes (YEUNG et al., 1996).

Os ANP e BNP são produzidos principalmente no átrio e no ventrículo cardíaco, respectivamente, influenciando diretamente a pressão e a homeostase dos fluidos corporais (MATSUKAWA et al., 1999). Em contraste ao ANP e BNP que atuam como hormônios cardiovasculares, o CNP é expresso fortemente no cérebro, mas também em outros tecidos, apresentando níveis normalmente baixos na circulação, e acredita-se que apresente função autócrina ou parácrina, sendo comumente considerado um hormônio com propriedades anti-mitogênicas, regulador da ossificação endocondral (MATSUKAWA et al., 1999) e com grandes evidências de estar envolvido em vários processos reprodutivos (WALTHER & STEPAN, 2004).

Receptores peptídeos natriuréticos

Os NP exercem seus efeitos fisiológicos através da interação com receptores na célula-alvo. A ligação dos NP a dois de seus receptores (NPR-1 e NPR-2) ativa guanilato ciclase, aumenta a concentração intracelular do segundo mensageiro guanosina monofosfato cíclico (GMPc), modulando a atividade biológica desses peptídeos (KONE, 2001). Dessa forma, regulando proteínas kinases dependentes de GMPc e específicas fosfodiesterases (PDE) (POTTHAST & POTTER, 2005).

São conhecidos três receptores para os NP. Os três receptores apresentam um domínio de ligação extracelular (aproximadamente 450 aminoácidos) e uma simples região trans-

membrana hidrofóbica (GARDNER et al., 2007; PORTER et al., 1990). Receptor NP-1 (NPR-1) e NPR-2 apresentam domínio intracelular idêntico, consistindo de um domínio tipo quinase, um domínio de dimerização e um domínio carboxi-terminal guanilato ciclase, sendo a sinalização desses dois receptores através da síntese de GMPc. NPR-1 apresenta alta expressão nos rins, pulmões, adrenal, tecido vascular e adiposo (LOWE et al., 1989), enquanto o NPR-2 apresenta alta expressão no cérebro, pulmões, rins, cartilagem e tecidos reprodutivos (SCHULZ et al., 1989). NPR-3 contém um domínio intracelular com 37 aminoácidos e não tem atividade guanilato ciclase, dessa forma, controlando as concentrações dos NP por internalizar e degradar o ligante (LEVIN et al., 1998). Por esse mesmo motivo, também é conhecido como receptor de limpeza, e é amplamente expresso em muitos tecidos (MATSUKAWA et al., 1999).

Os receptores NP apresentam especificidades diferentes para cada ligante. Segundo SUGA et al. (1992), o NPR-1 apresenta afinidade pelo ANP maior ou igual ao BNP e pouca para CNP, já o NPR-2 possui afinidade pelo CNP muito maior que para o ANP, que apresenta maior ou igual afinidade por esse receptor quando comparado ao BNP. A afinidade do CNP pelo NPR-2 é 50 e 500 vezes maior que o ANP e o BNP, respectivamente (KOLLER et al., 1991). O NPR-3 apresenta afinidade pelo ANP maior que para o CNP, que possui maior ou igual afinidade para o BNP (SUGA et al., 1992), de modo que em camundongos *knockout* para o NPR-3 a meia vida plasmática do ANP aumenta (MATSUKAWA et al., 1999).

Peptídeos Natriuréticos e retomada da meiose

Dentre os NPs, o CNP atuando via NPR-2 apresenta numerosas evidências de participação durante os processos reprodutivos. JANKOWSKI et al. (1997) demonstraram a presença do sistema NP, ligantes e receptores, no ovário de ratas, sendo que o CNP apresentou variações durante o ciclo estral, com máxima expressão durante o pró-estro. GUTKOWSKA et al. (1999) demonstraram que o sistema NP no ovário de ratas é regulado por gonadotrofinas,

especialmente FSH, e que CNP e NPR-2 aparecem como um importante sistema de regulação intraovariano. Em camundongos adultos, a expressão de CNP é destacada no tecido uterino e nos ovários (STEPAN et al., 2000). Nessa mesma espécie, o estradiol induz a expressão gênica de CNP no útero (ACUFF et al., 1997). Camundongos *knockout* para NPR-2 com 90 dias de vida não apresentavam corpo lúteo no ovário, e não apresentam indícios de ciclo estral com base nos dados de citologia vaginal (TAMURA et al., 2004). Em ratos a expressão de CNP e NPR-2, no ovário e útero, é modulada durante o ciclo estral, com máxima expressão no pró-estro (DOS REIS et al., 1995). Em camundongos, ZHANG et al. (2010) demonstraram que o CNP, produzido pelas células murais da granulosa, se liga ao NPR-2 no cumulus, que pode ter sua expressão e funcionalidade mantida por ação de estradiol, impedindo o reinício da meiose por inibir a PDE3 do oócito (ZHANG et al., 2011). Em suínos, recentemente foi observado função semelhante para o CNP (HIRADATE et al., 2013). Da mesma forma, em espécies multiovular, foi demonstrado que CNP estimula o crescimento de folículos pré-antrais e antrais (SATO et al., 2012), e também é essencial para manter a meiose bloqueada em folículos iniciando a formação do antro (TSUJI et al., 2012). Com o crescimento folicular, a expressão de CNP também é aumentada, atingindo os níveis mais elevados concomitantemente com o pico pré-ovulatório do LH (KAWAMURA et al., 2011), estimulando a produção de anphiregulina, os quais inibem a expressão de CNP, chegando aos níveis basais para que ocorra o reinício da meiose (TSUJI et al., 2012).

CONCLUSÃO

Com os avanços no entendimento dos processos de retomada da meiose e maturação nuclear oocitária foi possível explorar o potencial genético de fêmeas, proporcionar melhores resultados em técnicas assistidas de reprodução e, além disso, proporcionar avanços para diversos distúrbio de infertilidade e maior segurança em possíveis métodos contraceptivos. Recentemente foi demonstrado que o CNP é grande candidato para conquistar tais avanços,

principalmente por ser indispensável para manter a meiose bloqueada. Entretanto, ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas principalmente na interrelação entre os peptídeos natriuréticos e demais fatores no controle da meiose, especialmente em espécies monovulatórias, na qual os conhecimentos são escassos.

REFERÊNCIAS

ACUFF, C. G., et al. Estradiol induces C-type natriuretic peptide gene expression in mouse uterus. *Am J Physiol*, v.273, n.6 Pt 2, p.H2672-7. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9435603>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi:

BARRETA, M. H., et al. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E2 and F2alpha. *Reproduction*, v.136, n.6, p.733-40. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18768665>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: REP-08-0268 [pii]10.1530/REP-08-0268.

BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. *Theriogenology*, v.60, n.9, p.1679-90. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14580650>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: S0093691X03001730 [pii].

CHESNEL, F.; J. J. EPPIG. Synthesis and accumulation of p34cdc2 and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. *Mol Reprod Dev*, v.40, n.4, p.503-8. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7598915>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 10.1002/mrd.1080400414.

COLLEDGE, W. H., et al. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature*, v.370, n.6484, p.65-8. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8015609>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 10.1038/370065a0.

CONTI, M., et al. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol*, v.187, n.1-2, p.153-9. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11988323>>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

DE BOLD, A. J., et al. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci*, v.28, n.1, p.89-94. 1981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7219045>>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

DE VANT'ERY, C., et al. An accumulation of p34cdc2 at the end of mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. *Dev Biol*, v.174, n.2, p.335-44. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8631505>>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

DEKEL, N. Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. *Rev Reprod*, v.1, n.2, p.82-8. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9414444>>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

DOS REIS, A. M., et al. Characterization and distribution of natriuretic peptide receptors in the rat uterus. *Endocrinology*, v.136, n.10, p.4247-53. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7664642>>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

DOWNS, S. M. Regulation of the G2/M transition in rodent oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.77, n.7, p.566-85. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20578061>>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 10.1002/mrd.21175.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v.122, n.6, p.829-38. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11732978>>
<<http://www.reproduction-online.org/content/122/6/829.full.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

ERICKSON, B. H. DEVELOPMENT AND RADIO-RESPONSE OF THE PRENATAL BOVINE OVARY. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.11, n.1, p.97-105. 1966. Disponível em:

<<http://www.reproduction-online.org/content/11/1/97.abstract%3E>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 10.1530/jrf.0.0110097.

FAIR, T., et al. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev*, v.42, n.4, p.437-42. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8607973%3E>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 10.1002/mrd.1080420410.

FISSORE, R. A., et al. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biol Reprod*, v.55, n.6, p.1261-70. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8949882%3E>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

FLYNN, T. G., et al. The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem Biophys Res Commun*, v.117, n.3, p.859-65. 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6230081%3E>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

GARDNER, D. G., et al. Molecular biology of the natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension. *Hypertension*, v.49, n.3, p.419-26. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17283251%3E>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 01.HYP.0000258532.07418.fa [pii]10.1161/01.HYP.0000258532.07418.fa.

GAUTIER, J., et al. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell*, v.60, n.3, p.487-94. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1967981%3E>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 0092-8674(90)90599-A [pii].

GIOMETTI, I. C., et al. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. *Theriogenology*, v.63, n.4, p.1014-25. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15710189%3E>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: S0093-691X(04)00210-9 [pii]10.1016/j.theriogenology.2004.05.022.

GUTKOWSKA, J., et al. Hormonal regulation of natriuretic peptide system during induced ovarian follicular development in the rat. *Biol Reprod*, v.61, n.1, p.162-70. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10377045>>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

HASHIMOTO, N., et al. Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice. *Nature*, v.370, n.6484, p.68-71. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8015610>>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 10.1038/370068a0.

HIRADATE, Y. et al. C-type natriuretic peptide inhibits porcine oocyte meiotic resumption. *Zygote*, p. 1-6, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23331536> >. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

JANKOWSKI, M., et al. C-type natriuretic peptide and the guanylyl cyclase receptors in the rat ovary are modulated by the estrous cycle. *Biol Reprod*, v.56, n.1, p.59-66. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9002633>>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

KAWAMURA, K., et al. Pre-ovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes. *Hum Reprod*, v.26, n.11, p.3094-101. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21865234>>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: der282 [pii]10.1093/humrep/der282.

KOLLER, K. J., et al. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science*, v.252, n.5002, p.120-3. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1672777>>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

KONE, B. C. Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*, v.51, n.3, p.429-41. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11476733>>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: S0008636301003273 [pii].

KOSAKO, H., et al. Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation. *EMBO J*, v.13, n.9, p.2131-8. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8187766>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

KUMAGAI, A.; W. G. DUNPHY. Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. *Cell*, v.70, n.1, p.139-51. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1623517>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 0092-8674(92)90540-S [pii].

LEVIN, E. R., et al. Natriuretic peptides. *N Engl J Med*, v.339, n.5, p.321-8. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9682046>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 10.1056/NEJM199807303390507.

LIU, L.; X. YANG. Interplay of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase inactivation during metaphase-to-interphase transition of activated bovine oocytes. *Biol Reprod*, v.61, n.1, p.1-7. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10377024>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

LOWE, D. G., et al. Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction. *EMBO J*, v.8, n.5, p.1377-84. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2569967>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

MATSUKAWA, N., et al. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.96, n.13, p.7403-8. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10377427>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

MOTTA, P. M., et al. Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v.75, n.1, p.5-10. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9447340>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: S0301211597002169 [pii].

NAKAO, K., et al. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: Natriuretic peptides. *J Hypertens*, v.10, n.9, p.907-12. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1328371>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

NISHIKIMI, T., et al. Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. *J Cardiol*, v.57, n.2, p.131-40. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296556>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: S0914-5087(11)00003-7 [pii]10.1016/j.jjcc.2011.01.002.

OTOI, T., et al. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology*, v.48, n.5, p.769-74. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16728170>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: S0093-691X(97)00300-2 [pii].

PARK, J. Y., et al. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*, v.303, n.5658, p.682-4. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14726596>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 10.1126/science.10924631092463 [pii].

PENG, X. R., et al. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology*, v.129, n.6, p.3200-7. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1954899>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

PINCUS, G.; E. V. ENZMANN. The Comparative Behavior of Mammalian Eggs in Vivo and in Vitro : I. The Activation of Ovarian Eggs. *J Exp Med*, v.62, n.5, p.665-75. 1935. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19870440>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

PORTER, J. G., et al. Isolation and functional expression of the human atrial natriuretic peptide clearance receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun*, v.171, n.2, p.796-803. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2169733>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 0006-291X(90)91216-F [pii].

POTTER, L. R., et al. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev*, v.27, n.1, p.47-72. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16291870>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: er.2005-0014 [pii]10.1210/er.2005-0014.

POTTHAST, R.; L. R. POTTER. Phosphorylation-dependent regulation of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors. *Peptides*, v.26, n.6, p.1001-8. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15911068>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: S0196-9781(05)00083-5 [pii]10.1016/j.peptides.2004.08.033.

RICHARD, F. J.; M. A. SIRARD. Effects of follicular cells on oocyte maturation. I: Effects of follicular hemisections on bovine oocyte maturation in vitro. *Biol Reprod*, v.54, n.1, p.16-21. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8837995>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

RICHARDS, J. S. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev*, v.60, n.1, p.51-89. 1980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6243782>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

ROMERO, S.; J. SMITZ. Improvement of in vitro culture of mouse cumulus-oocyte complexes using PDE3-inhibitor followed by meiosis induction with epiregulin. *Fertil Steril*, v.93, n.3, p.936-44. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19022432>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: S0015-0282(08)04203-9 [pii]10.1016/j.fertnstert.2008.10.016.

SASSEVILLE, M., et al. Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. *Biol Reprod*, v.81, n.2, p.415-25. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357367>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: biolreprod.108.074450 [pii]10.1095/biolreprod.108.074450.

SATO, Y., et al. C-Type Natriuretic Peptide Stimulates Ovarian Follicle Development. *Mol Endocrinol*. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22595960>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: me.2012-1027 [pii]10.1210/me.2012-1027.

SCHULZ, S., et al. The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell*, v.58, n.6, p.1155-62. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2570641>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 0092-8674(89)90513-8 [pii].

SIRARD, M. A.; N. L. FIRST. In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol Reprod*, v.39, n.2, p.229-34. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2460146>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

SIRARD, M. A., et al. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod*, v.40, n.6, p.1257-63. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2775818>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

STEPAN, H., et al. Organ-specific mRNA distribution of C-type natriuretic peptide in neonatal and adult mice. *Regul Pept*, v.95, n.1-3, p.81-5. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11062336>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

SUDOH, T., et al. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature*, v.332, n.6159, p.78-81. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2964562>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 10.1038/332078a0.

SUDOH, T., et al. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun*, v.168, n.2, p.863-70. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2139780>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi.

SUGA, S., et al. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology*, v.130, n.1, p.229-39. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1309330>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi:

TAMURA, N., et al. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.101, n.49, p.17300-5. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15572448>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 0407894101 [pii]10.1073/pnas.0407894101.

TAWARAGI, Y., et al. Gene and precursor structures of human C-type natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun*, v.175, n.2, p.645-51. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2018508>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 0006-291X(91)91614-I [pii].

THOMAS, R. E., et al. Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. *Dev Biol*, v.244, n.2, p.215-25. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11944932>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 10.1006/dbio.2002.0609S0012160602906093 [pii].

TROUNSON, A., et al. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction*, v.121, n.1, p.51-75. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11226029>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi:

TSAFRIRI, A., et al. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. *Dev Biol*, v.178, n.2, p.393-402. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8812137>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: S0012-1606(96)90226-2 [pii]10.1006/dbio.1996.0226.

TSUJI, T., et al. CNP/NPR2 signaling maintains oocyte meiotic arrest in early antral follicles and is suppressed by EGFR-mediated signaling in preovulatory follicles. *Molecular Reproduction and*

Development, p.n/a-n/a. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/mrd.22114>>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 10.1002/mrd.22114.

VACCARI, S., et al. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod*, v.81, n.3, p.595-604. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19474061>>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: [10.1095/biolreprod.109.077768](https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077768) [pii]10.1095/biolreprod.109.077768.

WALTHER, T.; H. STEPAN. C-type natriuretic peptide in reproduction, pregnancy and fetal development. *J Endocrinol*, v.180, n.1, p.17-22. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14709140>>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14709140>>.

WU, B., et al. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod*, v.56, n.1, p.253-9. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9002657>>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9002657>>.

WU, C., et al. Furin-mediated processing of Pro-C-type natriuretic peptide. *J Biol Chem*, v.278, n.28, p.25847-52. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12736257>>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 10.1074/jbc.M301223200M301223200 [pii].

YAN, W., et al. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.97, n.15, p.8525-9. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10880574>>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 10.1073/pnas.150149097150149097 [pii].

YASODA, A., et al. Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat Med*, v.10, n.1, p.80-6. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14702637>>. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 10.1038/nm971nm971 [pii].

YEUNG, V. T., et al. Binding of CNP-22 and CNP-53 to cultured mouse astrocytes and effects on cyclic GMP. *Peptides*, v.17, n.1, p.101-6. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8822517>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 0196978195020993 [pii].

ZHANG, M., et al. Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. *Endocrinology*, v.152, n.11, p.4377-85. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21914782>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: en.2011-1118 [pii]10.1210/en.2011-1118.

ZHANG, M., et al. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science*, v.330, n.6002, p.366-9. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20947764>%3E. Acesso em: 25 jan. 2013. doi: 330/6002/366 [pii]10.1126/science.1193573.

5 RESULTADOS COMPLEMENTARES

5.1 Experimento I: Efeito do forskolin na expansão do cumulus oophorus em bovinos

O objetivo deste experimento foi buscar um novo modelo para estudar expansão do cumulus em COCs bovinos. Dessa forma, avaliamos se o forskolin inibe a ação do FSH na expansão do cumulus de CCOs bovinos, e além disso, se esse efeito é semelhante após 12 e 24 h de maturação *in vitro*. Para isso, CCOs (n=239) derivados de ovários de frigorífico foram fotografados individualmente (n=478) imediatamente antes (0 h) de serem colocados em estufa para maturação *in vitro*, e também ao final do cultivo, 12 ou 24 h dependendo do grupo, para a mensuração de sua área total. Grupos de 9 ou 10 CCOs foram aleatoriamente alocados nos tratamentos com 12 h ou 24 h de cultivo. O cultivo ocorreu em estufa a 39 °C, atmosfera com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada durante 12 ou 24 horas. O meio de maturação básico (TCM) consistiu de TCM-199 contendo sais de Earle e L-glutamina (Gibco Labs., Grand Island/USA), suplementado com 25 mM de HEPES, 2,2 mg/ml de bicarbonato de sódio, 0,2 mM de ácido pirúvico, 100 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de streptomina e 0,4% de albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos. O meio de maturação básico foi suplementado isoladamente com 0,5µg/ml de FSH (Folltropin[®]-V, Bioniche, Ontario/CA) ou 100 µM de forskolin ou com as suas associações, de acordo com o tratamento.

Os grupos experimentais para esse experimento foram: TCM; TCM + 0,5 µg/ml de FSH; TCM + 100 µM de Forskolin; TCM + 100 µM de Forskolin + 0,5 µg/ml de FSH. Nesse experimento, os oócitos iniciaram o cultivo com tamanho semelhante (0 h), e com 12 h de maturação *in vitro* o grupo TCM + FSH (255373,6µm²/CCO) apresentou a maior expansão (P<0,05) (Fig. 4). Nesse mesmo horário, TCM (167965,1µm²/CCO), FORSK + FSH (153767,6µm²/CCO) e FORSK (138962,2µm²/CCO) não diferiram estatisticamente (P>0,05). Com 24 h de cultivo TCM + FSH (310771,2µm²/CCO), FORSK + FSH (334111,3µm²/CCO) e FORSK (276403,9µm²/CCO) não diferiram estatisticamente entre si, e foram superiores ao grupo TCM. Somente no grupo TCM não houve diferença entre 12 e 24 h de cultivo (P>0,05).

Nos estudos de expansão do cumulus oophorus, a expansão geralmente é avaliada através de graduação visual, em escala de 0 (mínima expansão) a 4 (máxima expansão) (Downs, 1989; Vanderhyden, 1993), podendo ter valores diferentes para 2 observadores. Mensurando a área total de cada CCO, antes e após o cultivo, podemos obter resultados mais consistentes, e minimizar a chance de erros. Dessa forma, demonstramos que 100 µM de

forskolin é capaz de inibir a expansão do cumulus estimulada por FSH, semelhante ao grupo sem essa gonadrotrofina, por 12 h (Fig. 4), podendo ser utilizado como modelo para futuros estudos de expansão do cumulus em bovinos. No entanto, essa inibição não foi observada quando os CCOs foram cultivados por 24 h, possivelmente pela diminuição de AMPc causada pela degradação ou falta de estímulo para a produção de AMPc.

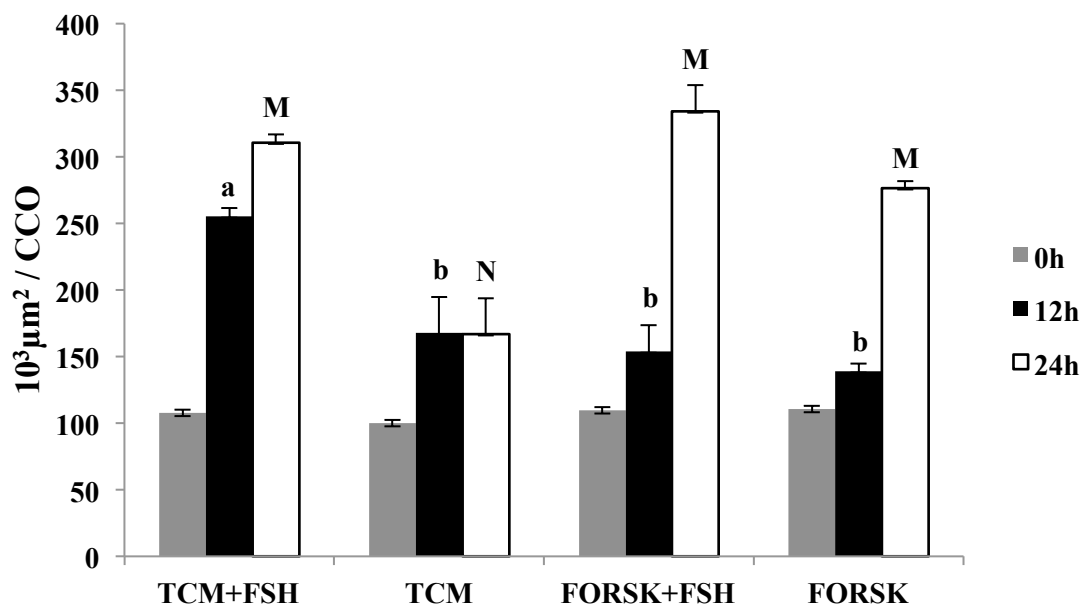


Figura 4. Modelo para estudo da expansão do cumulus oophorus, na qual foi mensurado a área total de cada CCO antes (0 h) e após 12 e 24 h do início do cultivo *in vitro*. Para o experimento foi utilizado 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de FSH e 100 μM de forskolin. O experimento foi realizado em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

5.2 Experimento II: Efeito dos peptídeos natriuréticos na expansão do cumulus oophorus em bovino.

Com base no experimento I, avaliamos a capacidade dos NPs em estimular a expansão do cumulus de CCOs (n=320) bovino inibida por 100 μ M forskolin. Images (n=620) de cada CCO foram capturadas imediatamente antes (0 h) dos mesmos serem colocados em estufa para maturação *in vitro* (mesmas condições descritas anteriormente) e também após 12 h de cultivo. Em todos os tratamentos o meio utilizado foi TCM (descrito no experimento anterior) maturação adicionados de 0,5 μ g/ml de FSH. Exceto no grupo controle positivo (n=28) os CCOs foram cultivados na presença de 100 μ M de forskolin, grupo controle negativo (n=28), ou associado a diferentes concentrações (10, 100 e 1000 nM) de ANP (n=84) e CNP (n=84). Além disso, 142 CCOs foram utilizados para avaliar o efeito dose-resposta do BNP (10, 100 e 1000 nM) na expansão do cumulus.

Da mesma forma que no experimento I, os CCOs iniciaram o cultivo com tamanhos semelhantes ($P > 0,05$), e após 12 h de maturação *in vitro* os grupos controle positivo (258314,9 μ m²/CCO), ANP1000 (211775,6 μ m²/CCO) e CNP10 (215139,5 μ m²/CCO) foram semelhantes entre si e superior ao controle negativo (148117,5 μ m²/CCO) e ao CNP1000 (151602,4 μ m²/CCO), que não diferiram (Fig. 5). Porém, ANP1000 e CNP10 não diferiram estatisticamente dos grupos ANP10 (190486,9 μ m²/CCO), ANP100 (186416,7 μ m²/CCO) e CNP100 (186238,5 μ m²/CCO). O BNP apresentou resultado semelhante aos outros dois NPs na expansão do cumulus, na qual BNP100 (219439,04 μ m²/CCO) não diferiu do controle positivo, e ambos foram superior ao controle negativo (Fig. 6). BNP10 (175820,3 μ m²/CCO) e BNP1000 (180675,2 μ m²/CCO) não diferiram entre si, nem do controle negativo e do BNP100. De modo que, ao menos uma dose de cada NP estimulou a expansão do cumulus (Fig. 5 e 6).

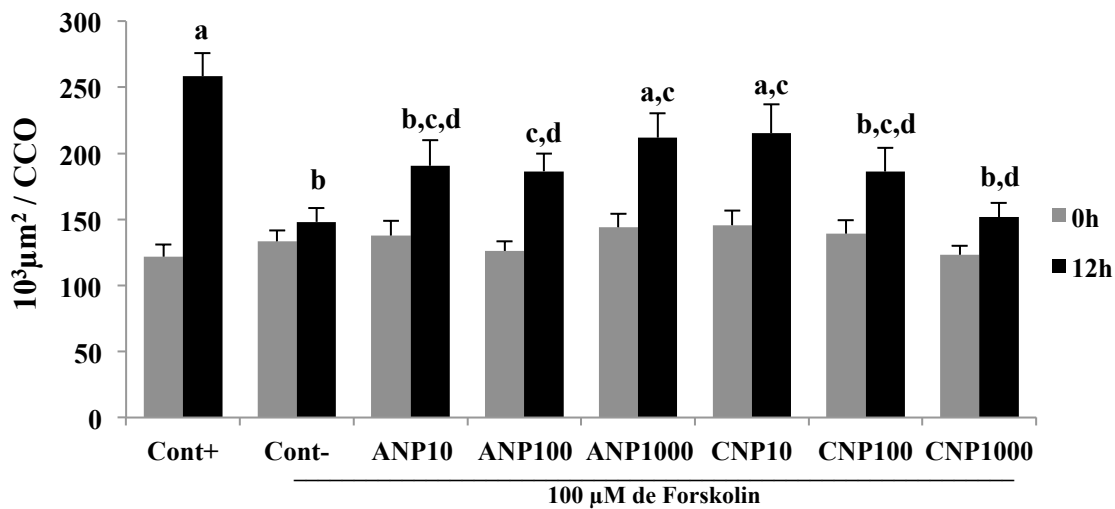


Figura 5. Dose-resposta do ANP e CNP na expansão do cumulus oophorus em bovino. A área total de cada CCO foi mensurada antes (0 h) e após 12 h do início do cultivo *in vitro*. Para este experimento, foi utilizado 0,5 μg/ml de FSH em todos os grupos e 100 μM de Forskolin exceto no controle positivo (Cont+). Além disso, utilizou-se três diferentes concentrações (10, 100 e 1000 nM) de ANP e CNP. O experimento foi realizado em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística (P<0,05).

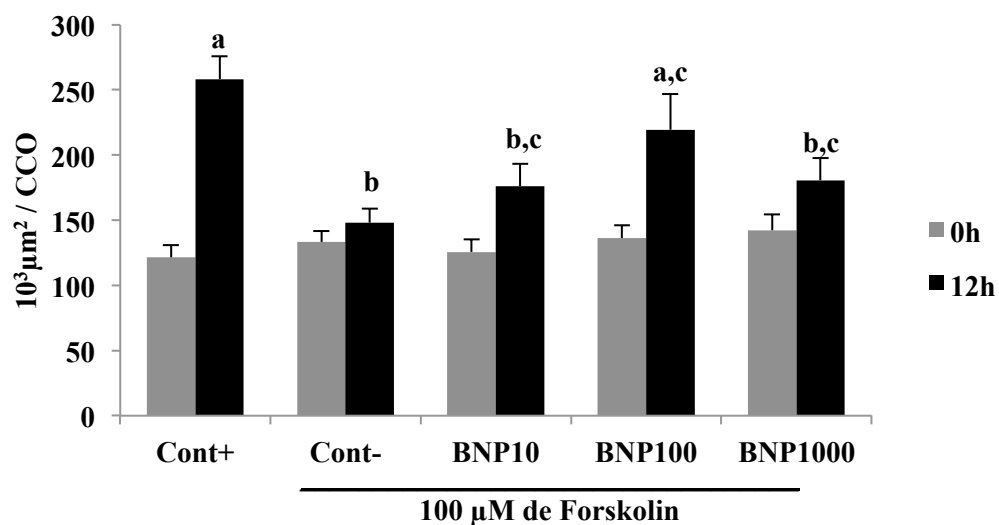


Figura 6. Dose-resposta do BNP na expansão do cumulus oophorus em bovino. A área total de cada CCO foi mensurada antes (0 h) e após 12 h do início do cultivo *in vitro*. Para este experimento, foi utilizado 0,5 μg/ml de FSH em todos os grupos e 100 μM de forskolin exceto no controle positivo (Cont+). Além disso, utilizou-se três diferentes concentrações (10, 100 e 1000 nM) de BNP. O experimento foi realizado em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram pela primeira vez a caracterização do sistema peptídeos natriurético nos CCOs, observando RNAm para ANP, CNP, NPR-1, NPR-2 e NPR-3 no cumulus, e para NPR-2 no oócito. Além disso, foi observado que em bovinos os peptídeos natriuréticos (ANP, BNP e CNP) apresentam função de mediadores intrafoliculares do LH, na qual estimulam a retomada da meiose e expansão do cumulus.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acuff, C. G., *et al.* Estradiol induces C-type natriuretic peptide gene expression in mouse uterus. **Am J Physiol**, v.273, n.6 Pt 2, p.H2672-7. 1997.

Barreta, M. H., *et al.* Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E2 and F2alpha. **Reproduction**, v.136, n.6, p.733-40. 2008.

Bilodeau-Goeseels, S. Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. **Theriogenology**, v.60, n.9, p.1679-90. 2003.

Chesnel, F. e J. J. Eppig. Synthesis and accumulation of p34cdc2 and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. **Mol Reprod Dev**, v.40, n.4, p.503-8. 1995.

Colledge, W. H., *et al.* Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. **Nature**, v.370, n.6484, p.65-8. 1994.

Conti, M., *et al.* Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Mol Cell Endocrinol**, v.187, n.1-2, p.153-9. 2002.

De Bold, A. J., *et al.* A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. **Life Sci**, v.28, n.1, p.89-94. 1981.

De Vant'ery, C., *et al.* An accumulation of p34cdc2 at the end of mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. **Dev Biol**, v.174, n.2, p.335-44. 1996.

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

Dos Reis, A. M., *et al.* Characterization and distribution of natriuretic peptide receptors in the rat uterus. **Endocrinology**, v.136, n.10, p.4247-53. 1995.

Downs, S. M. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus in vitro. **Biol Reprod**, v.41, n.2, p.371-9. 1989.

Downs, S. M. Regulation of the G2/M transition in rodent oocytes. **Mol Reprod Dev**, v.77, n.7, p.566-85. 2010.

Eppig, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v.122, n.6, p.829-38. 2001.

Erickson, B. H. DEVELOPMENT AND RADIO-RESPONSE OF THE PRENATAL BOVINE OVARY. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.11, n.1, p.97-105. 1966.

Fair, T., *et al.* Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Mol Reprod Dev**, v.42, n.4, p.437-42. 1995.

Ferreira, R., *et al.* The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**, v.134, n.5, p.713-9. 2007.

Fissore, R. A., *et al.* Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. **Biol Reprod**, v.55, n.6, p.1261-70. 1996.

Flynn, T. G., *et al.* The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. **Biochem Biophys Res Commun**, v.117, n.3, p.859-65. 1983.

Gardner, D. G., *et al.* Molecular biology of the natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension. **Hypertension**, v.49, n.3, p.419-26. 2007.

Gautier, J., *et al.* Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. **Cell**, v.60, n.3, p.487-94. 1990.

Giometti, I. C., *et al.* Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v.63, n.4, p.1014-25. 2005.

Gutkowska, J., *et al.* Hormonal regulation of natriuretic peptide system during induced ovarian follicular development in the rat. **Biol Reprod**, v.61, n.1, p.162-70. 1999.

Hashimoto, N., *et al.* Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice. **Nature**, v.370, n.6484, p.68-71. 1994.

Hiradate, Y., *et al.* C-type natriuretic peptide inhibits porcine oocyte meiotic resumption. **Zygote**, p.1-6. 2013.

Jankowski, M., *et al.* C-type natriuretic peptide and the guanylyl cyclase receptors in the rat ovary are modulated by the estrous cycle. **Biol Reprod**, v.56, n.1, p.59-66. 1997.

Kawamura, K., *et al.* Pre-ovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes. **Hum Reprod**, v.26, n.11, p.3094-101. 2011.

Koller, K. J., *et al.* Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). **Science**, v.252, n.5002, p.120-3. 1991.

Kone, B. C. Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases. **Cardiovasc Res**, v.51, n.3, p.429-41. 2001.

Kosako, H., *et al.* Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation. **EMBO J**, v.13, n.9, p.2131-8. 1994.

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

Leibfried, L. e N. L. First. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **J Anim Sci**, v.48, n.1, p.76-86. 1979.

- Levin, E. R., *et al.* Natriuretic peptides. **N Engl J Med**, v.339, n.5, p.321-8. 1998.
- Liu, L. e X. Yang. Interplay of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase inactivation during metaphase-to-interphase transition of activated bovine oocytes. **Biol Reprod**, v.61, n.1, p.1-7. 1999.
- Lowe, D. G., *et al.* Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction. **EMBO J**, v.8, n.5, p.1377-84. 1989.
- Luo, W. e M. C. Wiltbank. Distinct regulation by steroids of messenger RNAs for FSHR and CYP19A1 in bovine granulosa cells. **Biol Reprod**, v.75, n.2, p.217-25. 2006.
- Maack, T., *et al.* Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. **Science**, v.238, n.4827, p.675-8. 1987.
- Matsukawa, N., *et al.* The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, n.13, p.7403-8. 1999.
- Misono, K. S., *et al.* Structure, signaling mechanism and regulation of the natriuretic peptide receptor guanylate cyclase. **FEBS J**, v.278, n.11, p.1818-29. 2011.
- Motta, P. M., *et al.* Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.75, n.1, p.5-10. 1997.
- Nagase, M., *et al.* Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens**, v.15, n.11, p.1235-43. 1997.
- Nakao, K., *et al.* Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: Natriuretic peptides. **J Hypertens**, v.10, n.9, p.907-12. 1992.

Nishikimi, T., *et al.* Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. **J Cardiol**, v.57, n.2, p.131-40. 2011.

Noubani, A., *et al.* B-type natriuretic peptide receptor expression and activity are hormonally regulated in rat ovarian cells. **Endocrinology**, v.141, n.2, p.551-9. 2000.

Otoi, T., *et al.* Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. **Theriogenology**, v.48, n.5, p.769-74. 1997.

Park, J. Y., *et al.* EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v.303, n.5658, p.682-4. 2004.

Paulis, L. e T. Unger. Novel therapeutic targets for hypertension. **Nat Rev Cardiol**, v.7, n.8, p.431-41. 2010.

Peng, X. R., *et al.* Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. **Endocrinology**, v.129, n.6, p.3200-7. 1991.

Pincus, G. e E. V. Enzmann. The Comparative Behavior of Mammalian Eggs in Vivo and in Vitro : I. The Activation of Ovarian Eggs. **J Exp Med**, v.62, n.5, p.665-75. 1935.

Porter, J. G., *et al.* Isolation and functional expression of the human atrial natriuretic peptide clearance receptor cDNA. **Biochem Biophys Res Commun**, v.171, n.2, p.796-803. 1990.

Potter, L. R., *et al.* Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. **Endocr Rev**, v.27, n.1, p.47-72. 2006.

Potthast, R. e L. R. Potter. Phosphorylation-dependent regulation of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors. **Peptides**, v.26, n.6, p.1001-8. 2005.

Richard, F. J. e M. A. Sirard. Effects of follicular cells on oocyte maturation. I: Effects of follicular hemisections on bovine oocyte maturation in vitro. **Biol Reprod**, v.54, n.1, p.16-21. 1996.

Richards, J. S. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiol Rev**, v.60, n.1, p.51-89. 1980.

Robinson, J. W., *et al.* Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes. **Dev Biol**, v.366, n.2, p.308-16. 2012.

Romero, S. e J. Smitz. Improvement of in vitro culture of mouse cumulus-oocyte complexes using PDE3-inhibitor followed by meiosis induction with epiregulin. **Fertil Steril**, v.93, n.3, p.936-44. 2010.

Sasseville, M., *et al.* Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. **Biol Reprod**, v.81, n.2, p.415-25. 2009.

Sato, Y., *et al.* C-Type Natriuretic Peptide Stimulates Ovarian Follicle Development. **Mol Endocrinol**. 2012.

Schulz, S., *et al.* The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. **Cell**, v.58, n.6, p.1155-62. 1989.

Sirard, M. A. Temporary inhibition of meiosis resumption in vitro by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v.33, n.4, p.757-67. 1990.

Sirard, M. A. e N. L. First. In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. **Biol Reprod**, v.39, n.2, p.229-34. 1988.

Sirard, M. A., *et al.* Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biol Reprod**, v.40, n.6, p.1257-63. 1989.

Stefanello, J. R., *et al.* Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. **Theriogenology**, v.66, n.9, p.2068-76. 2006.

Stepan, H., *et al.* Organ-specific mRNA distribution of C-type natriuretic peptide in neonatal and adult mice. **Regul Pept**, v.95, n.1-3, p.81-5. 2000.

Sudoh, T., *et al.* A new natriuretic peptide in porcine brain. **Nature**, v.332, n.6159, p.78-81. 1988.

Sudoh, T., *et al.* C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. **Biochem Biophys Res Commun**, v.168, n.2, p.863-70. 1990.

Suga, S., *et al.* Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. **Endocrinology**, v.130, n.1, p.229-39. 1992.

Tamura, N., *et al.* Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.101, n.49, p.17300-5. 2004.

Tawaragi, Y., *et al.* Gene and precursor structures of human C-type natriuretic peptide. **Biochem Biophys Res Commun**, v.175, n.2, p.645-51. 1991.

Thomas, R. E., *et al.* Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. **Dev Biol**, v.244, n.2, p.215-25. 2002.

Tornell, J., *et al.* Atrial natriuretic peptide inhibits spontaneous rat oocyte maturation. **Endocrinology**, v.126, n.3, p.1504-8. 1990.

Trounson, A., *et al.* Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. **Reproduction**, v.121, n.1, p.51-75. 2001.

Tsafiri, A., *et al.* Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. **Dev Biol**, v.178, n.2, p.393-402. 1996.

Tsuji, T., *et al.* CNP/NPR2 signaling maintains oocyte meiotic arrest in early antral follicles and is suppressed by EGFR-mediated signaling in preovulatory follicles. **Molecular Reproduction and Development**, p.n/a-n/a. 2012.

Vaccari, S., *et al.* Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. **Biol Reprod**, v.81, n.3, p.595-604. 2009.

Vanderhyden, B. C. Species differences in the regulation of cumulus expansion by an oocyte-secreted factor(s). **J Reprod Fertil**, v.98, n.1, p.219-27. 1993.

Walther, T. e H. Stepan. C-type natriuretic peptide in reproduction, pregnancy and fetal development. **J Endocrinol**, v.180, n.1, p.17-22. 2004.

Wu, B., *et al.* Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. **Biol Reprod**, v.56, n.1, p.253-9. 1997.

Wu, C., *et al.* Furin-mediated processing of Pro-C-type natriuretic peptide. **J Biol Chem**, v.278, n.28, p.25847-52. 2003.

Yan, W., *et al.* Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, n.15, p.8525-9. 2000.

Yasoda, A., *et al.* Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. **Nat Med**, v.10, n.1, p.80-6. 2004.

Yeung, V. T., *et al.* Binding of CNP-22 and CNP-53 to cultured mouse astrocytes and effects on cyclic GMP. **Peptides**, v.17, n.1, p.101-6. 1996.

Zaffalon, F. G., *et al.* 268 cyclic guanosine monophosphate inhibits phosphodiesterase 3 activity in porcine oocytes. **Reprod Fertil Dev**, v.25, n.1, p.282. 2012.

Zhang, M., *et al.* Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. **Endocrinology**, v.152, n.11, p.4377-85. 2011.

Zhang, M., *et al.* Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science**, v.330, n.6002, p.366-9. 2010.