

Estado da publicação: O preprint foi submetido para publicação em um periódico

Efeito do cilostazol na produção in vitro de ovinos

Jossimara de Melo Silva, Beatriz Cavalcanti de Freitas, William Matheus Souza, Damaris Raquel Pires dos Santos, Érika Karoline de Oliveira Aureliano, Andreza Mayara Carneiro Lima, Luana Kealy Pimentel de Oliveira, Mabel Freitas Cordeiro, Edilson Soares Lopes Júnior

<https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.6009>

Submetido em: 2023-05-01

Postado em: 2023-05-05 (versão 1)

(AAAA-MM-DD)

EFEITO DO CILOSTAZOL NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE OVINOS

JOSSIMARA DE MELO SILVA

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-5237-7152>

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

Correspondência: jossimaramelosilva@gmail.com

BEATRIZ CAVALCANTI DE FREITAS

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-1073-1555>

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

WILLIAM MATHEUS SOUZA

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7701-2304>

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

DAMARIS RAQUEL PIRES DOS SANTOS

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-5269-7983>

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

ÉRIKA KAROLINE DE OLIVEIRA AURELIANO

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-3875-2494>

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

ANDREZA MAYARA CARNEIRO LIMA

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6192-5937>

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

LUANA KEALY PIMENTEL DE OLIVEIRA

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6440-5515>

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

MABEL FREITAS CORDEIRO

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1963-7311>

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

EDILSON SOARES LOPES JÚNIOR

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4790-8134>

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inclusão de cilostazol no meio de maturação *in vitro* de oócitos sobre produção *in vitro* de embriões ovinos. Para isso, foram realizadas colheitas de oócitos oriundos de ovários obtidos em abatedouro por meio do método de aspiração folicular com bomba de vácuo. Os oócitos foram divididos em quatro grupos de maturação: grupo CON, onde os complexos cumulus oócitos foram imersos em TCM-199, suplementado com 500 UI de penicilina, 0,5 mg de estreptomicina, 1,25 µg de anfotericina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 10 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF), 10 µg/m de FSH, 10 µg/mL de LH, 10 µg/mL de estradiol e 100 µM de cisteamina; e nos grupos CILO0,3; CILO1 e CILO10, os oócitos foram maturados no meio do grupo CON, mas sem a adição de cisteamina e suplementado com as concentrações de 0,3; 1 e 10 µM, respectivamente. Após 24h, os oócitos foram avaliados quanto a presença ou não de células do cumulus e quanto ao grau de expansão e destinados à fecundação *in vitro*, em meio FIV, juntamente com espermatozoides. Após a FIV, os presumíveis zigotos seguiram para o cultivo *in vitro*. Foram avaliadas clivagens no dia 2, sendo dia 0 o dia do início do CIV. Os resultados foram expressos em porcentagem e as variáveis de expansão das células do cumulus e número de estruturas clivadas foram comparadas por meio do teste qui-quadrado do software Epi Info (Epi Info 7.2.5, Atlanta, GA, EUA, 2021). Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$. Em relação à expansão das células do cumulus, todos os grupos apresentaram 100% de expansão. Não houve diferenças significativas quanto ao grau de expansão das células do cumulus entre os grupos suplementados com cilostazol e cisteamina ($P > 0,05$), assim como não houve diferenças significativas entre as taxas de clivagem entre os grupos suplementados com cilostazol e cisteamina ($P > 0,05$).

Palavras-chave: embrião, FIV, MIV, ovelha, PIV.

EFFECT OF CILOSTAZOL ON *IN VITRO* PRODUCTION OF SHEEP

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effect of including cilostazol in the *in vitro* maturation medium of oocytes on the *in vitro* production of sheep embryos. Oocytes were collected from ovaries obtained from a slaughterhouse by follicular aspiration with a vacuum pump. The oocytes were divided into four maturation groups: the CON group, where the cumulus-oocyte complexes were immersed in TCM-199 supplemented with 500 IU of penicillin, 0.5 mg of streptomycin, 1.25 µg of amphotericin, 0.2 mM of sodium pyruvate, 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 10 ng/mL of epidermal growth factor (EGF), 10 µg/mL of FSH, 10 µg/mL of LH, 10 µg/mL of estradiol, and 100 µM of cysteamine; and in the CILO0.3, CILO1, and CILO10 groups, the oocytes were matured in the CON group medium without the addition of cysteamine and supplemented with concentrations of 0.3, 1, and 10 µM of cilostazol, respectively. After 24 hours, the oocytes were evaluated for the presence or absence of cumulus cells and the degree of expansion and then subjected to *in vitro* fertilization (IVF) with sperm in FIV medium. After IVF, the presumptive zygotes were cultured *in vitro*. Cleavage was evaluated on day 2, with day 0 being the start of IVF. Results were expressed as a percentage, and variables such as cumulus cell expansion and the number of cleaved structures were compared using the chi-square test in the Epi Info software (Epi Info 7.2.5, Atlanta, GA, USA, 2021). Results were considered significant when $P < 0.05$. All groups showed 100% cumulus cell expansion, and there were no significant differences in cumulus cell expansion degree between the cilostazol- and cysteamine-supplemented groups ($P > 0.05$), as well as no significant differences in cleavage rates between the cilostazol- and cysteamine-supplemented groups ($P > 0.05$).

Key words: embryo, IVF, IVM, IVP, ovine.

EFEECTO DEL CILOSTAZOL EN LA PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE OVEJAS

RESUMEN: El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la inclusión de cilostazol en el medio de maduración *in vitro* de ovocitos sobre la producción *in vitro* de embriones ovinos. Para ello, se realizaron recolecciones de ovocitos provenientes de ovarios obtenidos en un matadero mediante el método de aspiración folicular con bomba de vacío. Los ovocitos se dividieron en cuatro grupos de maduración: grupo CON, donde los complejos cúmulus ovocitos se sumergieron en TCM-199, suplementado con 500 UI de penicilina, 0,5 mg de estreptomina, 1,25 µg de anfotericina, 0,2 mM de piruvato de sodio, 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB), 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 10 µg/m de FSH, 10 µg/mL de LH, 10 µg/mL de estradiol y 100 µM de cisteamina; y en los grupos CILO0,3; CILO1 y CILO10, los ovocitos se maduraron en el medio del grupo CON, pero sin la adición de cisteamina y suplementado con las concentraciones de 0,3; 1 y 10 µM, respectivamente. Después de 24 horas, los ovocitos se evaluaron en cuanto a la presencia o no de células del cúmulus y en cuanto al grado de expansión y se destinaron a la fecundación *in vitro*, en medio FIV, junto con espermatozoides. Después de la FIV, los presuntos cigotos siguieron para el cultivo *in vitro*. Se evaluaron las clivajes en el día 2, siendo el día 0 el día del inicio del CIV. Los resultados se expresaron en porcentaje y las variables de expansión de las células del cúmulus y número de estructuras clivadas se compararon mediante la prueba del chi-cuadrado del software Epi Info (Epi Info 7.2.5, Atlanta, GA, EE. UU., 2021). Los resultados se consideraron significativos cuando $P < 0,05$. En relación a la expansión de las células del cúmulus, todos los grupos presentaron el 100% de expansión. No hubo diferencias significativas en cuanto al grado de expansión de las células del cúmulus entre los grupos suplementados con cilostazol y

cisteamina ($P > 0,05$), así como no hubo diferencias significativas entre las tasas de clivaje entre los grupos suplementados con cilostazol y cisteamina ($P > 0,05$).

Palabras clave: embrión, FIV, MIV, ovino, PIV.

INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma biotécnica que consiste na preparação e co-cultivo de gametas em ambiente laboratorial para a geração do zigoto e seu cultivo até o estágio de desenvolvimento embrionário desejado (1). Suas etapas compreendem a colheita, maturação *in vitro* (MIV) e fecundação *in vitro* (FIV) de oócitos, bem como o cultivo (CIV) dos possíveis embriões gerados.

A PIV possui diversos tipos de vantagens, como, por exemplo, possibilitar a obtenção de embriões por meio de fêmeas que apresentam problemas reprodutivos de caráter adquirido ou após a sua morte e até mesmo de fêmeas pré-púberes, gestantes, lactantes e idosas (2). Além disso, essa biotecnologia diminui o intervalo entre as gerações dos animais, acelera o melhoramento genético, amplia a vida reprodutiva de animais de alto valor genético portadores de alterações adquiridas, facilita a comercialização internacional do material genético e permite a formação de bancos de gametas e embriões criopreservados.

O sucesso da etapa de maturação *in vitro* é fundamental para a produção de embriões de qualidade, tornando necessário formular um meio de maturação preciso para esclarecer as demandas nutricionais e metabólicas dos oócitos e embriões ovinos obtidos *in vitro*, o que levará ao sucesso na produção *in vitro* de embriões (3). Para isso, são utilizadas neste meio substâncias com potencial para diminuir o estresse oxidativo e, conseqüentemente, reduzir as taxas de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de glutatona peroxidase. Componentes alternativos com essa função têm sido utilizados na PIV, como o cilostazol.

O cilostazol (CLZ) é um modulador do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) que influencia o estado estacionário da fase meiótica durante a maturação oocitária (4). O AMPc, por sua vez, é um mensageiro produzido pelas células do cumulus em resposta ao LH ou FSH e transportado para os oócitos através de numerosas junções comunicantes (5,6), desempenhando um papel duplo na regulação e bloqueio meiótico e na iniciação da retomada meiótica em oócitos (7). Quando os oócitos são removidos dos folículos, a hidrólise do AMPc é aumentada pela fosfodiesterase 3A (PDE3A), o nível de AMPc diminui e, então, a meiose é retomada (8,9).

Estudos mostram que a indução artificial de AMPc melhora significativamente o desenvolvimento de oócitos e sua competência (10,11,12). Já a inibição de PDE3A é capaz de prevenir a maturação espontânea e induzida por gonadotrofinas de oócitos em várias espécies, incluindo humanos e primatas não humanos (8). O CLZ é um dos inibidores de PDE3A com capacidade de aumentar os níveis de AMPc, inibindo a sua degradação. Seu efeito benéfico já foi relatado na maturação *in vitro* de oócitos de suínos, iaques e camundongos. No entanto, até onde sabemos, não há relatos de seu uso em oócitos de ovinos (4, 13, 14).

Desta forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da inclusão do cilostazol no meio de maturação *in vitro* de oócitos sobre a produção *in vitro* de zigotos ovinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), sendo registrado sob o protocolo de Nº 0011/280820.

Os meios e reagentes para colheita, avaliação, maturação e fecundação *in vitro* de oócitos, bem como cultivo *in vitro* de embriões foram adquiridos na Sigma Aldrich Brasil®.

O experimento ocorreu no Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal (LAFIBRA), do Campus de Ciências Agrárias, na Universidade Federal do Vale do São Francisco, em Petrolina-PE.

Foram utilizados ovários ovinos obtidos do Abatedouro Frigorífico de Caprinos e Ovinos de Rajada, Pernambuco, logo após o abate de ovelhas Sem Padrão Racial Definido (SPRD), imediatamente após o abate. Os ovários foram transportados até o LAFIBRA em uma temperatura entre 33 °C e 34 °C, dentro de 1 hora, em solução de NaCl 0,9%, contendo 0,05 g de pentabiótico/L, sendo o pentabiótico composto por estreptomicina básica, dihidroestreptomicina básica, benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína e benzilpenicilina potássica. No LAFIBRA, os ovários foram lavados, três vezes, em solução salina aquecida, retirados os tecidos adjacentes e mantidos em banho-maria, a 34 °C. Para a colheita dos complexos cumulus-oócitos (CCO), foi utilizada uma bomba de vácuo, a 5 mL/min, agulha 18G e o meio de recuperação composto por TCM 199 com 25 mM de HEPES, suplementado com 500 UI de penicilina, 0,5 mg de estreptomicina, 1,25 µg de anfotericina, soro fetal bovino (SFB) e 5 UI/mL de heparina. Logo após a colheita, os CCO foram dispostos no meio de recuperação, vertidos em placas de petri de 100 mm, analisados sob estereomicroscópio e qualificados de acordo com Freitas, Melo (15), sendo selecionados, para a maturação *in vitro*, os de Graus I e II, ou seja, oócitos com citoplasma levemente granulado, com múltiplas camadas de cumulus (Grau I) ou com, no mínimo, uma a três camadas uniformes de células do cumulus (Grau II).

Após a seleção e classificação oocitária, os CCO de melhor qualidade foram mantidos em meio de recuperação até o momento da maturação, quando foram divididos em quatro grupos: grupo CON, com CCO imersos em meio composto de TCM-199, suplementado com 500 UI de penicilina, 0,5 mg de estreptomicina, 1,25 µg de anfotericina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 10 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF), 10 µg/mL de FSH, 10 µg/mL de LH, 10 µg/mL de estradiol e 100 µM de cisteamina.; nos grupos CIL0,3; CIL1 e CIL10 os CCO foram incluídos no meio do grupo CON, mas sem cisteamina e contendo 0,3; 1 e 10 µM de cilostazol, respectivamente. Os CCO foram dispostos em placa de petri de 100 mm, em número de 15 CCO por gota de 75 µL de meio MIV, durante 24 horas, em estufa de cultivo, a 38,5 °C, em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Após a MIV, os oócitos foram considerados maduros quando apresentaram expansão das células do cumulus. Além disso, os CCO maduros foram avaliados quanto ao grau de expansão das células do cumulus, classificando-os conforme a metodologia de Aghaz et al. (16) em: total (Grau 1), moderado (Grau 2) e leve (Grau 3).

O sêmen utilizado na fecundação *in vitro* (FIV) foi colhido através de vagina artificial, a partir de um carneiro com fertilidade comprovada. O sêmen foi disposto em cima de uma coluna de Percoll 45%/90%. Os espermatozoides móveis foram selecionados por centrifugação, a 700G, por 15 minutos. O precipitado foi resuspenso em 2 mL de meio de FIV (SOF®, suplementado com 500 UI de penicilina, 0,5 mg de estreptomicina, 1,25 µg de anfotericina, 10% de soro de ovelha em estro, 10 µg/mL de hipotaurina e 1 mg/mL de heparina sódica) e lavado por centrifugação (100G; 5 minutos). O novo precipitado foi resuspenso em 2 mL de meio FIV. A concentração final foi de 1 x 10⁶ espermatozoides/mL, em 50 µL/gota de meio FIV, em placa de petri de 100 mm, sob óleo mineral. Somente os oócitos maduros provenientes do melhor grupo de MIV e os espermatozoides selecionados foram incluídos nas gotas (75 µL) de FIV, onde foram subdivididos em: grupo CON, composto por oócitos maduros e espermatozoides, imersos em gotas de 50 µL de meio SOF®, suplementado com 500 UI de penicilina, 0,5 mg de estreptomicina, 1,25 µg de anfotericina, 10% de soro de ovelha em estro, 10 µg/mL de hipotaurina e 10 µg/mL de heparina sódica. A FIV ocorreu por 18 a 20 horas, em estufa de cultivo, a 38,5 °C, com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂. As estruturas foram consideradas fecundadas quando apresentaram clivagem embrionária, o que foi avaliado,

somente, após a etapa de cultivo *in vitro* de presumíveis zigotos.

Após a FIV, os presumíveis zigotos foram submetidos à sucessivas pipetagens em meio de CIV (SOF®, suplementado com 3 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) e 500 UI de penicilina), para remoção das células do cumulus, ou seja, para seu desnudamento. Os presumíveis zigotos, após o desnudamento, foram cultivados, por 48 h, em meio de CIV, sob óleo mineral, em placas de petri, contendo de 10 a 15 estruturas por gota, em estufa de cultivo, a 38,5 °C, com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂. O número de estruturas clivadas foi registrado no fim do período de cultivo, avaliados quanto a taxa de clivagem, sob um microscópio invertido (BEL INV-100®; BEL, São Paulo, Brasil).

Os resultados foram expressos na forma de porcentagem e as variáveis de graus de expansão das células do cumulus e número de estruturas clivadas foram comparadas usando o teste do Qui-quadrado no software Epi Info (Epi Info 7.2.5, Atlanta, GA, EUA, 2021). Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com relação à expansão das células do cumulus estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Graus de expansão (alta, moderada e leve), dentro de cada grupo de maturação *in vitro* (CON, CIL0,3, CIL1, CIL10) de oócitos ovinos colhidos por punção folicular de ovário de abatedouro.

Tratamentos	Nº CCO I e II	Taxa de expansão % (n)	Grau de expansão % (n)		
			Total	Moderado	Leve
CON	12	100 (12/12)	50 (6/12) ^{aA}	50 (6/12) ^{aA}	0 (0/12) ^{aA}
CIL 0,3	19	100 (19/19)	21,05 (4/19) ^{aA}	42,11(8/19) ^{aA}	36,84 (7/19) ^{aA}
CIL 1	17	100 (17/17)	35,29 (6/17) ^{aA}	35,29 (6/17) ^{aA}	29,41 (5/17) ^{aA}
CIL 10	22	100 (22/22)	36,36 (8/22) ^{aA}	36,36 (8/22) ^{aA}	27,27 (6/22) ^{aA}

^{a, b} Valores com letras minúsculas diferentes entre colunas indicam diferença significativa ($P < 0,05$); ^{A, B} Valores com letras maiúsculas diferentes entre linhas indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Quanto aos graus de expansão das células do cumulus (Tabela 1), não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos testados. Da mesma forma, não houve diferença ($P > 0,05$) em relação aos graus de expansão total, moderada e leve ao comparar os tratamentos com cilostazol ao grupo controle (CON). Ao analisar as comparações dentro de cada grupo de tratamento, também não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$).

O cilostazol é um modulador de AMPc que age através da inibição da PDE3A, uma enzima que tem efeitos negativos na maturação dos oócitos e influencia a retomada meiótica espontânea de oócitos imaturos (4). Moduladores de AMPc, em geral, são utilizados durante a maturação *in vitro* como uma estratégia para retomar a maturação meiótica (17,18). No entanto, a concentração exata de moduladores, como o cilostazol, na MIV e o tempo de tratamento ideal para melhorar a técnica ainda não estão totalmente elucidados.

Elahi et al. (4) relataram que o tratamento com CIL não influenciou a maturação nuclear de oócitos de suínos e nem o conteúdo intraoocitário de glutathione peroxidase em nenhuma das concentrações testadas (0,5 µM, 2 µM e 4 µM). Já o estudo realizado por Xiong-X et al. (13), que utilizou 5 µM de cilostazol em oócitos de iaque antes da MIV, aumentou significativamente as percentagens de oócitos na fase de metáfase II em comparação com o grupo tratado sem CIL.

Por outro lado, Li et al. (14) demonstraram que a utilização de 1 µM de CIL tem um efeito reversível na retomada meiótica de oócitos de camundongos, uma vez que a utilização

dessa concentração na MIV impediu a progressão da maturação, entretanto, após a remoção da substância, a meiose recomeçou e os oócitos de camundongo amadureceram *in vitro*. A variação nas concentrações de CIL na resposta dos oócitos pode ser explicada, portanto, pelas diferenças entre as espécies testadas e a forma como elas respondem ao tratamento, além da variação no lote e na pureza do cilostazol, bem como na duração de cada tratamento.

. Os achados de maturação *in vitro* de Elahi et al. (4) e Li et al. (14) são consistentes, em parte, com o presente estudo, uma vez que o cilostazol também não demonstrou ter efeitos significativamente melhores que o grupo CON durante a MIV de oócitos ovinos (Tabela 1). Uma possível explicação para nossos achados é que o CIL é um inibidor de PDE3A, a inibição desta enzima aumenta os níveis de AMPc, resultando no bloqueio da quebra da vesícula germinativa dos oócitos. A PDE3A pode regular a retomada da meiose até 3 horas antes da quebra da vesícula germinativa, afetando transitoriamente a progressão meiótica (9,19).

Além disso, moduladores de AMPc, como o cilostazol, podem regular negativamente a meiose dos oócitos se a concentração inadequada for utilizada ou se os oócitos forem tratados por muito tempo (20). Em nosso estudo, a MIV teve duração de 24 horas e foram utilizadas as concentrações de 0,3 μ M, 1 μ M e 10 μ M de cilostazol no meio de maturação *in vitro*, em comparação ao meio comercial sem cilostazol, que contém o antioxidante cisteamina. Esses fatores podem ter afetado negativamente a maturação dos oócitos ovinos no tratamento com cilostazol. No entanto, ainda não estão elucidadas as concentrações ideais e o tempo ideal de tratamento com cilostazol em oócitos ovinos.

Os resultados obtidos com relação à taxa de clivagem após a fecundação *in vitro* estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 – Número de presumíveis zigotos e número de estruturas clivadas dentro de cada grupo de tratamento.

Tratamentos	Oócitos maturados	% de clivados
CON	12	58,33 (7/12) ^A
CIL 0,3	19	5,26 (1/19) ^A
CIL 1	17	0 (0/17) ^A
CIL 10	22	18,18 (4/22) ^A

^{A,B,C} Letras maiúsculas indicam comparações na mesma coluna (P<0,05).

Após a fecundação *in vitro* (Tabela 2), não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas em relação às estruturas clivadas entre os grupos CON, CIL 0,3, CIL 1 e CIL 10 (P>0,05). No entanto, observou-se uma tendência do grupo CON apresentar uma taxa de clivagem maior quando comparado aos demais grupos de tratamento.

A maturação oocitária é uma etapa crucial para o sucesso da fecundação *in vitro* de oócitos, uma vez que somente oócitos que atingiram as competências necessárias durante a maturação podem ser capazes de ser fecundados e produzir embriões de qualidade (3). A cisteamina é um antioxidante comumente utilizado em meios comerciais de maturação *in vitro* de ovinos, e seu efeito na MIV e posterior desenvolvimento de células fecundadas de qualidade já foi comprovado (21, 22).

Embora sem diferença significativa (P>0,05), as clivagens do grupo CON, que continha cisteamina no meio de MIV, tenderam a ser maiores do que os demais tratamentos com cilostazol (Tabela 2). Esse achado pode ser explicado pelo fato de que a cisteamina possivelmente levou os oócitos a um estágio de maturação mais competente em comparação com o cilostazol, que pode inibir a maturação dependendo do tempo e concentração utilizados (9, 19, 20). Consequentemente, isso pode explicar o grupo CON ter gerado uma maior quantidade de presumíveis zigotos após a fecundação.

Apesar de nosso estudo não ter encontrado resultados satisfatórios na formação de presumíveis zigotos com o uso de cilostazol (Tabela 2), outros estudos mostraram resultados positivos. Elahi et al. (4) observaram que a concentração de 4 μM de cilostazol durante a MIV foi eficiente na formação de blastocistos suínos em comparação ao grupo controle. Xiong-X et al. (13) observaram que o uso de 5 μM de cilostazol para tratar oócitos de iaques antes da MIV aumentou as taxas de clivagem e formação de células de blastocisto em comparação ao grupo controle. Além disso, Li et al. (14) observaram que após a retirada do cilostazol do tratamento de MIV, os oócitos de camundongo amadureceram e, após a fecundação, houve uma melhora na taxa de clivagem embrionária e formação de blastocistos quando comparados com o grupo controle sem cilostazol.

O cilostazol, portanto, parece ter efeitos diferentes na fecundação *in vitro* e no número de células fecundadas após o seu tratamento durante a MIV, dependendo da espécie, concentração e tempo de tratamento.

CONCLUSÃO

A suplementação de cilostazol nas concentrações de 0,3 μM , 1 μM e 10 μM no meio de maturação *in vitro* parece não ser benéfica para oócitos ovinos e a subsequente produção de células fecundadas após a FIV. São necessários mais estudos a fim de definir uma concentração adequada de cilostazol no meio de MIV de ovinos, assim como definir o tempo adequado de tratamento com cilostazol na MIV de ovinos.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

DECLARAÇÃO DE DISPONIBILIDADE DE DADOS DA PESQUISA

Todo o conjunto de dados de apoio aos resultados deste estudo foi publicado no próprio artigo.

DECLARAÇÃO DE CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Autor 1 – Conceitualização, curadoria de dados, pesquisa, metodologia, administração do projeto e redação do manuscrito.

Autor 2 – Pesquisa, metodologia e redação do manuscrito.

Autor 3 – Pesquisa e metodologia.

Autor 4 – Pesquisa e metodologia.

Autor 5 – Pesquisa e metodologia.

Autor 6 – Pesquisa e metodologia.

Autor 7 – Análise dos dados, pesquisa e metodologia.

Autor 8 – Pesquisadora supervisora responsável pela pesquisa relatada, participação ativa na análise dos dados e revisão da escrita final do manuscrito.

Autor 9 – Pesquisador supervisor responsável pela pesquisa relatada, participação ativa na análise dos dados e revisão da escrita final do manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Luedke FE, Lavach FL, Cassanta FG, Nunes LFN, Schlotefeld C, Paiva SM, Santos SI, Neves AP. Aspectos da produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil – revisão. Pesquisa Agropecuária Gaúcha. 2019;25(1/2):120–32. doi: 10.36812/pag.2019251/2120-132
2. Chaves MS, Silva JCF, Melo LM, Santos AS, Oliveira MAL, Freitas VJF. É possível incrementar o sucesso da PIVE em pequenos ruminantes? Revista Brasileira de Reprodução Animal. 2021;45(4):246–52. doi:10.21451/1809-3000.rbra2021.032
3. Accardo C, Dattena M, Pilichi S, Mara L, Chessa B, Cappai P. Effect of recombinant human FSH and LH on *in vitro* maturation of sheep oocytes; embryo development and viability. Animal Reproduction Science. 2004;81(1–2):77–86. doi: 10.1016/j.anireprosci.2003.10.004
4. Elahi F, Lee H, Lee Y, Park B, Lee J, Hyun S-H, Lee E. Cilostazol Improves Developmental Competence of Pig Oocytes by Increasing Intraocyte Cyclic Adenosine Monophosphate Level and Delaying Meiotic Resumption. Reproduction in Domestic Animals. 2016;51(2):220–6. doi: 10.1111/rda.12669
5. Schultz RM, Montgomery RR, Belanoff JR. Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. Developmental biology. 1983;97(2):264–273. doi: 10.1016/0012-1606(83)90085-4
6. Racowsky C. Effect of forskolin on maintenance of meiotic arrest and stimulation of cumulus expansion, progesterone and cyclic AMP production by pig oocyte-cumulus complexes. Journal of reproduction and fertility. 1985;74(1):9–21. doi: 10.1530/jrf.0.0740009
7. Shimada M, Terada T. Roles of cAMP in regulation of both MAP kinase and p34(cdc2) kinase activity during meiotic progression, especially beyond the MI stage. Molecular reproduction and development. 2002;62(1):124–131. doi: 10.1002/mrd.10075
8. Masciarelli S, Horner K, Liu C, Park SH, Hinckley M, Hockman S, Nedachi T, Jin C, Conti M, Manganiello V. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. The Journal of clinical investigation. 2004;114(2):196–205. doi: 10.1172/JCI21804
9. Sasseville M, Côté N, Guillemette C, Richard FJ. New insight into the role of phosphodiesterase 3A in porcine oocyte maturation. BMC developmental biology, 2006;6:47. doi: 10.1186/1471-213X-6-47
10. Vanhoutte L, Nogueira D, Dumortier F, De Sutter P. Assessment of a new *in vitro* maturation system for mouse and human cumulus-enclosed oocytes: three-dimensional prematuration culture in the presence of a phosphodiesterase 3-inhibitor. Human reproduction. 2009;24(8):1946–1959. doi: 10.1093/humrep/dep104
11. Albuz FK, Sasseville M, Lane M, Armstrong DT, Thompson JG, Gilchrist RB. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. Human Reproduction. 2010;25(12):2999–3011. doi: 10.1093/humrep/deq246
12. Sugimura S, Yamanouchi T, Palmerini MG, Hashiyada Y, Imai K, Gilchrist RB. Effect of pre-*in vitro* maturation with cAMP modulators on the acquisition of oocyte developmental

- competence in cattle. *Journal of Reproduction and Development*. 2018;64(3):233–241. doi: 10.1262/jrd.2018-009
13. Xiong X-R, Lan D-L, Li J, Lin Y-Q, Li M-Y. Supplementation of cilostazol during *in vitro* maturation enhances the meiosis and developmental competence of yak oocytes by influencing cAMP content and mRNA expression. *Animal Reproduction Science*. 2017;186:21–30. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.08.013
 14. Li M, Yu Y, Yan J, Yan L-Y, Zhao Y, Li R, Liu P, Hsueh AJ, Qiao J. The Role of Cilostazol, a Phosphodiesterase 3 Inhibitor, on Oocyte Maturation and Subsequent Pregnancy in Mice. Wang H, editor. *PLoS ONE*. 2012;7(1):e30649. doi: 10.1371/journal.pone.0030649
 15. Freitas VJF, Melo LM. *In vitro* embryo production in small ruminants. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2010;39:409–13. doi: 10.1590/s1516-35982010001300045
 16. Aghaz F, Hajarian H, Shabankareh HK, Abdolmohammadi A. Effect of sericin supplementation in maturation medium on cumulus cell expansion, oocyte nuclear maturation, and subsequent embryo development in Sanjabi ewes during the breeding season. *Theriogenology*. 2015;84(9):1631–5. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.08.013
 17. Li HJ, Sutton-McDowall ML, Wang X, Sugimura S, Thompson JG, Gilchrist RB. Extending prematuration with cAMP modulators enhances the cumulus contribution to oocyte antioxidant defence and oocyte quality via gap junctions. *Human Reproduction*. 2016;31(4):810–21. doi: 10.1093/humrep/dew020
 18. Park B, Lee H, Lee Y, Elahi F, Lee J, Lee ST, Park CK, Hyun SH, Lee E. Cilostamide and forskolin treatment during pre-IVM improves preimplantation development of cloned embryos by influencing meiotic progression and gap junction communication in pigs. *Theriogenology*. 2016;86(3):757–65. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.02.029
 19. Jee BC, Chen H-Y, Chian R-C. Effect of a phosphodiesterase type 3 inhibitor in oocyte maturation medium on subsequent mouse embryo development. *Fertility and Sterility*. 2009;91(5):2037–2042. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.03.041
 20. Zeng H-T, Richani D, Sutton-McDowall ML, Ren Z, Smitz JEJ, Stokes Y, Gilchrist RB, Thompson JG. Prematuration with Cyclic Adenosine Monophosphate Modulators Alters Cumulus Cell and Oocyte Metabolism and Enhances Developmental Competence of *In Vitro*-Matured Mouse Oocytes1. *Biology of Reproduction*. 2014;91(2). doi: 10.1095/biolreprod.114.118471
 21. Gulo FDK, Karja NWK, Setiadi MA. Cysteamine in Maturation Medium Enhances Nuclear Maturation and Fertilization Rate of Sheep Oocytes *In Vitro*. *HAYATI Journal of Biosciences*. 2020;27(4):290. doi: 10.4308/hjb.27.4.290
 22. Wani AR, Khan MZ, Sofi KA, Lone FA, Malik AA, Bhat FA. Effect of cysteamine and epidermal growth factor (EGF) supplementation in maturation medium on *in vitro* maturation, fertilization and culturing of embryos in sheep. *Small Ruminant Research*. 2012;106(2–3):160–4. doi: 10.1016/j.smallrumres.2012.02.015

Este preprint foi submetido sob as seguintes condições:

- Os autores declaram que estão cientes que são os únicos responsáveis pelo conteúdo do preprint e que o depósito no SciELO Preprints não significa nenhum compromisso de parte do SciELO, exceto sua preservação e disseminação.
- Os autores declaram que os necessários Termos de Consentimento Livre e Esclarecido de participantes ou pacientes na pesquisa foram obtidos e estão descritos no manuscrito, quando aplicável.
- Os autores declaram que a elaboração do manuscrito seguiu as normas éticas de comunicação científica.
- Os autores declaram que os dados, aplicativos e outros conteúdos subjacentes ao manuscrito estão referenciados.
- O manuscrito depositado está no formato PDF.
- Os autores declaram que a pesquisa que deu origem ao manuscrito seguiu as boas práticas éticas e que as necessárias aprovações de comitês de ética de pesquisa, quando aplicável, estão descritas no manuscrito.
- Os autores declaram que uma vez que um manuscrito é postado no servidor SciELO Preprints, o mesmo só poderá ser retirado mediante pedido à Secretaria Editorial do SciELO Preprints, que afixará um aviso de retratação no seu lugar.
- Os autores concordam que o manuscrito aprovado será disponibilizado sob licença [Creative Commons CC-BY](#).
- O autor submissor declara que as contribuições de todos os autores e declaração de conflito de interesses estão incluídas de maneira explícita e em seções específicas do manuscrito.
- Os autores declaram que o manuscrito não foi depositado e/ou disponibilizado previamente em outro servidor de preprints ou publicado em um periódico.
- Caso o manuscrito esteja em processo de avaliação ou sendo preparado para publicação mas ainda não publicado por um periódico, os autores declaram que receberam autorização do periódico para realizar este depósito.
- O autor submissor declara que todos os autores do manuscrito concordam com a submissão ao SciELO Preprints.