EVERTON LOPES

Ação da proteína kinase C na maturação de oócitos bovinos

São Paulo

2012

EVERTON LOPES

Ação da proteína kinase C na maturação de oócitos bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção

De Acordo: _____

Orientadora

São Paulo

2012

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2589
FMVZ

Lopes, Everton
Ação da Proteína Kinase C na maturação de oócitos bovinos / Everton
Lopes. -- 2012.
79 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal,
São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção.

1. Bloqueio meiótico. PKC. EGF. Oócito bovino. Gonadotrofinas.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética para uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Ação da proteína kinase C na maturação de oócitos bovinos", protocolado sob o nº1777/2009, utilizando número indeterminado de ovários de vacas abatidas em abatedouros comerciais, sob a responsabilidade da Profa Dra Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética para uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 25/11/2009.

We certify that the Research "Protein Kinase C, role on bovine oocyte maturation", protocol number 1777/2009, under the responsibility Profa Dra Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethics Committee for animal use" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 11/25/2009.

São Paulo, 30 de novembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LOPES, Everton

Título: Ação da proteína kinase C na maturação de oócitos bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

DEDICO

A quem sempre apoiou e se fez presente

Dinoral, Ana, Priscila (*in memorian*), Angélica, Eder, Fábio

Maria Clara

E a quem estarei sempre presente

Bianca

AGRADEÇO

À Universidade de São Paulo.

Ao Departamento de Reprodução Animal e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora Prof. Mayra, por tornar possível este trabalho.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal, pelos ensinamentos e convívio durante o curso.

Ao Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular – LFEM, em especial ao Dr. Fernando Mesquita e ao Prof. Dr. Mario Binelli, pela recepção, paciência e pelas inúmeras ajudas.

Ao Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia – LBSA, em especial ao Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, pelo suporte dado durante boa parte da realização deste projeto.

À Profa. Dra. Claudia Leal, pela disponibilidade sempre que precisei.

Ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) da Universidade Federal do ABC, em especial os Professores Arnaldo, Marcela Sorelli, Marcela Milazzoto e Marcelo, pela recepção, compreensão e pelo apoio irrestrito durante o período em que frequentei o laboratório.

Ao Laboratório de Imunologia dos Transplantes, e a todos os seus integrantes que me ajudaram muito numa fase importante, Prof. Dr. Niels, Dra. Mariane Amano, Meire, Candinho, Enio, Ana, Ângela.

Ao Weber, por toda força ao longo do mestrado. Suas ideias foram fundamentais do início ao fim deste trabalho.

Ao Laboratório de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal, a todos os amigos e colegas que dividiram esse tempo comigo: Adriano, Alexandre, Camilla, Fernanda, Flavia, Giana, Julia, Juliana, Letícia, Mari Xum, Mariana Giassete, Mariana Groke, Patrícia, Paulo, Pedro, Robinson, Samir, Thais, Zeca.

Aos amigos da UNIFESP, Jéssica, sempre disposta a ajudar, Fabíola, amiga para toda hora, Pedro, companheiro sempre presente e Rafa, pessoa ímpar, que muito ajudou e muito compartilhou durante nosso mestrado.

À minha família, meu pai, Dinoral, minha mãe Ana, minha irmã Angélica, meu irmão Eder e meu cunhado Fábio, pelo, apoio, compreensão, paciência e todo suporte que me ofereceram ao longo da minha vida.

À Maria Clara, que desde o começo me incentivou, e jamais saiu do meu lado.

Aos meus amigos Pedro e Trícia, pela confiança, pela grande amizade desde os tempos de Lavras e por toda a força que me deram.

Ao meu grande amigo Caio, figura sempre presente e com quem muitas ideias troquei e diferentes pensamentos surgiram na área da biologia.

Aos amigos Fernandinho e Carina, pela eterna amizade.

À Cassiana pela ajuda importante num momento fundamental, e pela grande amizade.

À Clínica Dog Saúde e todos os seus integrantes, que durante esses anos me ajudaram: Julio, Diego, Janilton, Marcio, Lucimar, Camila, Tati, Andrea, Fabião, Tio Orlando, Mariana, Adriana, Cris, Fernanda, Jonathan, Débora Theoto, Rafael, Simone, Antonio, Camila, Debora Coelho, Kiki. Em especial, agradeço a Dra. Célia, pelo apoio irrestrito, pela confiança em todos os momentos, por compreender meus objetivos e por tornar boa parte disso possível.

Ao amigo João Sergio, pelas infinitas ajudas nas mais variadas circunstâncias.

À dupla João Bosco e Bambirra,, companheiros inestimáveis, que muito participaram, e apoiaram. Foi com vocês que aprendi a buscar esse objetivo.

Aos queridos amigos Amaury, Maria, Caio e Mariana, pelo apoio e amizade.

Aos amigos do Departamento de Reprodução Animal, todos que estão presentes e os que passaram durante essa fase. Obrigado pela amizade e pela companhia, principalmente nos churrascos do VRA.

Aos Amigos de Pirassununga pelo apoio, pela ajuda e pelo companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) da UFABC Carlos, Kelly, Mayra, Mariana, Fernanda (s), Rogério, Michele.

À República Platelpinto virax, pelo apoio durante minha permanência no ABC.

Ao grande amigo Zé Nélcio, que sempre me apoiou a seguir na área e fez questão de acompanhar a minha caminhada de perto.

À Renata, pela amizade, conselhos, broncas e tudo mais, uma irmã mais velha, chata como deve ser, mas que não tem palavras para descrever o quanto te admiro. Não bastasse tudo, ainda agradeço pelas novas amizades que me proporcionou: Guiliano, Adriana, Fábio Muricy, a quem também agradeço a amizade, e estamos no aguardo da Marina.

*“Ah o tempo faz, tempo desfaz
E vai além sempre...
...A vida vem lá de longe
É como se fosse um rio
Pra rio pequeno canoa
Pros grandes rios navios...
...No rastro da lua cheia
Se chega em qualquer lugar!”*

Almir Sater

“I knew all the rules, but the rules did not know me”

Eddie Vedder

“There are no impossible dreams”

OZZY Osourne

RESUMO

LOPES, E. **Ação da Proteína Kinase C na maturação de oócitos bovinos.** [Role of Protein Kinase C on bovine oocyte maturation]. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A qualidade do oócito é um fator limitante na fertilidade das fêmeas e reflete seu intrínseco potencial ao desenvolvimento embrionário subsequente. As alterações moleculares e bioquímicas no processo de maturação dos oócitos são necessárias para permitir a fecundação destes. Sob influência das gonadotrofinas, uma cascata de eventos é desencadeada, alterando a expressão gênica e a estrutura dos folículos. A maturação ocorre pelo intercâmbio entre o oócito e as células do *cumulus* que irão fornecer fatores para o desenvolvimento do oócito e criar o microambiente necessário para garantir o sucesso na maturação. A ação do FSH sobre a retomada da meiose ocorre, possivelmente, por ativação da proteína quinase C (PKC). A via de sinalização desta proteína parece estar envolvida na ativação da quinase ativada por mitógeno (MAPK) em oócitos e células do *cumulus*, na maturação induzida por FSH e LH, além de regular a síntese do Fator de Crescimento Epidermal (EGF). Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação da PKC na maturação de oócitos bovinos e se esta ativação envolve o EGF. Para tal foram realizados dois experimentos. Em ambos, a progressão do ciclo celular foi avaliada utilizando a sonda fluorescente Hoechst 33342. A expansão das células do *cumulus* foi avaliada utilizando-se o software Image Pro Plus 5.1 para análise das imagens dos oócitos geradas em microscópio Olympus IX81. O maior diâmetro de cada complexo *cumulus* oócito foi adotado como parâmetro de mensuração da expansão. A dosagem de progesterona do meio de cultivo foi realizada pela técnica de RIA. A ativação da PKC e da MAPK foi avaliada pela técnica de Western blot. Os dados foram avaliados pelo software SigmaPlot versão 12.2 e submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk). Quando necessário, os dados foram transformados. Para comparação entre dois tratamentos, utilizou-se o teste t-student. Para mais de dois tratamentos foi realizada análise de variância e teste de comparação de médias (TUKEY), considerando-se 0,05 para rejeitar a hipótese de nulidade. No experimento 1 foi avaliado se a ativação da PKC foi estimulada por gonadotrofinas. Os oócitos foram maturados *in vitro* tratados com gonadotrofinas, na presença ou ausência do inibidor de PKC. A presença do inibidor de PKC diminuiu as taxas de quebra de vesícula germinativa e a expansão das células do *cumulus*, sem alterar a esteroidogênese. Estes resultados demonstram que a PKC participa da via de sinalização da retomada da meiose. No experimento 2 foi avaliado se o EGF está envolvido na via regulada pela PKC. Os

oócitos foram maturados *in vitro*, na presença ou ausência de LH e FSH, do inibidor de PKC e do EGF. O EGF foi capaz de reverter os efeitos do inibidor de PKC, aumentando as taxas de quebra de vesícula germinativa e a expansão de células do *cumulus*. Não foi possível detectar, nas condições deste experimento, a ativação das proteínas PKC e MAPK através do Western Blot. Este trabalho permite concluir que a via de sinalização da maturação de oócitos bovinos envolve a PKC e sugere a participação do EGF nesta via.

Palavras-chave: Bloqueio meiótico. PKC. EGF. Oócito bovino. Gonadotrofinas.

ABSTRACT

LOPES, E. **Role of Protein Kinase C on bovine oocyte maturation.** [Ação da Proteína Kinase C na maturação de oócitos bovinos]. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Oocyte quality is a limiting factor in female fertility and reflects its potential to the subsequent embryonic development. Molecular and biochemical alterations during the oocyte maturation process are needed to allow fecundation. Under gonadotropin influence, cascade of events occurs changing gene expression and follicle structure. Maturation depends on the interaction between oocyte and cumulus cells interaction, which provides factors for oocyte development and create the ideal microenvironment for the success of the maturation process. The FSH stimulation of meiosis resumption probably occurs through PKC activation. The signaling pathway of PKC might be involved by the mitogen activated protein kinase (MAPK) in oocytes and cumulus cells during FSH-LH induced maturation. Furthermore, MAPK regulates the epidermal growth factor (EGF) synthesis. The aim of the present study was to evaluate PKC function during bovine oocyte maturation and if its activity involves EGF. Two experiments were performed. In both experiments, the cell cycle progression was analyzed by Hoechst 33342 fluorescent dye. The cumulus cells expansion was performed using software Image Pro Plus 5.1 by the analysis of oocyte images taken in Olympus IX81 microscope. The highest diameter of each cumulus oocyte complex was recorded as the expansion value. The RIA and Western Blot techniques were used to measure progesterone concentration in the culture media and the PKC and MAPK activity, respectively. Data was analyzed by SigmaPlot software, version 12.2. The Shapiro-Wilk test was used to assess for normality and, when needed, the data was transformed. Student t tests were carried out to compare two treatments. Differences between more than two means were assessed by analysis of variance followed by Tukey test, considering P-value lower than 0.05 as statistically significant. Experiment 1 studied whether PKC function was stimulated by gonadotropins. FSH and LH were used for oocyte maturation in vitro, with or without PKC inhibitor. The presence of PKC inhibitor decreased germinal vesicle breakdown and the cumulus cells expansion, but did not alter the steroidogenesis. These results show that PKC participates in the signaling pathway of meiosis resumption. The Experiment 2 evaluated whether EGF influences PKC signaling pathway. The oocytes were matured in vitro, in the presence or absence of LH and FSH, PKC inhibitor and EGF. Epidermal Growth Factor was able to reverse PKC inhibitor effects,

increasing germinal vesicle breakdown rates and cumulus cells expansion. The Western Blot technique was not able to detect PKC and MAPK activity, considering the conditions of this study. In conclusion, PKC is involved in the signaling pathway of bovine oocytes maturation and its pathway is mediated by EGF.

Key words: Meiotic arrest. PKC. EGF. Bovine oocyte. Gonadotropins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Regulação do bloqueio meiótico em mamíferos.....	28
Figura 2 -	Modelo proposto para retomada da meiose induzida por gonadotrofinas de oócitos de mamíferos em folículos pré-ovulatórios.....	33
Figura 3 -	Efeito da inibição da PKC na retomada da meiose de oócitos bovinos. Os dados representam a porcentagem de oócitos no estágio de Vesícula Germinativa (VG) ou não (Pós-VG) após 24 horas de maturação com diferentes tratamentos hormonais na presença ou não do inibidor de PKC (BIM). Observa-se em (A) que a PKC esta envolvida na retomada espontânea do ciclo celular ou na retomada do ciclo celular na maturação mediada por LH e LH associado com FSH (LH/FSH). Fotos ilustrativas dos oócitos avaliados com Hoechst 33342 nos estádios de VG e metáfase II (MII) são observados em (B). Letras diferentes representam diferença significativa para $p<0.01$	48
Figura 4 -	A PKC esta envolvida na expansão das células do <i>cumulus</i> durante a maturação. A inibição da PKC afeta negativamente a expansão das células do <i>cumulus</i> em oócitos bovinos maturados na ausência ou presença de FSH, LH ou na associação de ambos (FSH/LH). Letras diferentes representam diferença significativa para $p<0.01$. Os números presente nos gráficos representam a media da distância em pixels do maior diâmetro de cada complexo <i>cumulus</i> oócito. As fotos ilustram a expansão das células do <i>cumulus</i> em cada tratamento.....	50
Figura 5 -	Efeito do EGF na retomada da meiose de oócitos bovinos. Em (A), observa-se que o EGF reverte o bloqueio meiótico dos oócitos promovido pela inibição da PKC durante a maturação. A inibição da PKC não apresenta efeito na indução da retomada da meiose promovida pelo EGF (B). Fotos ilustrativas dos oócitos marcados com Hoechst 33342 nos estádios de VG e metáfase II (MII) podem ser observadas em (C). letras diferentes significam diferença estatística ($p<0.01$). Os números nos gráficos representam a porcentagem de oócitos no estágio de Vesícula Germinativa (VG) ou não (Pós-VG).....	52
Figura 6 -	Figura 3 – Avaliação do EGF na expansão das células do <i>cumulus</i> . Observa-se em (A) que inibição da expansão das células do <i>cumulus</i> promovida pelo inibidor de PKC (BIM) e revertida pelo EGF. A expansão das células do <i>cumulus</i> promovida pelo EGF não e afetada pela inibição da PKC como ilustrado em (B). Pode-se observar em (C) fotos ilustrativas da expansão das células do cumulos nos diferentes tratamentos (da esquerda para a direita: 1,	

oócito sem indução hormonal; 2 oócito maturado com FSH/LH; 3 oócito após 24 horas de maturação com FSH/LH + BIM e 4 oócito maturado na presença de FSH/LH + BIM + EGF. letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0.01$). Os números presente nos gráficos representam a media da distância em pixels do maior diâmetro de cada complexo *cumulus* oócito..... 54

Figura 7 - A PKC não esta envolvida na produção de progesterona pelo complexo *cumulus*-oócito durante a maturação in vitro de oócitos bovino. Em (A), observa-se o efeito da inibição da PKC na produção de progesterona durante a maturação sem hormônio, com FSH, com LH e coma a associação de FSH + LH. Pode-se observar em (B) a concentração de progesterona produzida durante a maturação com FSH, com EGF ou com a associação de ambos (FSH + EGF.). A inibição da PKC não afeta a produção de progesterona durante a maturação promovida pelo EGF. Os dados representam a concentração de progesterona em ng/ml..... 56

Figura 8 - Membranas incubadas com anticorpo anti PKC. A: anti-corpo anti PKC fosforilada, resultado obtido durante padronização da técnica. B: anti-corpo anti PKC Total. C: anti-corpo anti PKC fosforilada em uma das replicatas..... 57

Figura 9 - Membranas incubadas com anticorpo anti MAPK. A: anti-corpo anti MAPK fosforilada, resultado obtido durante padronização da técnica. B: anti-corpo anti MAPK Total. C: anti-corpo anti MAPK fosforilada em uma das replicatas..... 57

Figura 10 - Modelo Gráfico da via de sinalização da PKC na Maturação do oócito. Via de sinalização das gonadotrofinas na retomada da meiose. A via LH/FSH - PKC é ativada.O EGF compensa os efeitos da inibição da PKC Ocorre expansão das células do *cumulus* e quebra da vesícula germinativa (VG). A via LH/FSH-PKC-EGF é sugerida, envolvendo possivelmente a MAPK. São Paulo, 2012. 67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Delineamento experimental dos tratamentos utilizados no Experimento 1.....	35
Quadro 2 - Delineamento experimental dos tratamentos utilizados no Experimento 2.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BIM	bisindolylmaleimide I
cAMP	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CCO	complexo <i>Cumulus</i> Oócito
CDK1	ciclina dependente de quinase 1
cGMP	guanosina monofosfato cíclico
cGMP	guanosina mono fosfato
CO ₂	<i>dióxido de carbono</i>
DAG	Diacilglicerol
DNA	ácido desoxirribonucleico
EGF	<i>fator de Crescimento Epidermal</i>
EGFR	receptor de <i>fator de Crescimento Epidermal</i>
ERK	quinase regulada por sinal extracelular
FITC	Isoticianato de Fluresceína
FSH	hormônio folículo estimulante
GnRH	hormônio Liberador de Gonadotrofinas
GPR3	proteína G
IP3	inositol trifosfato
LH	hormônio luteinizante
MAPK	quinase ativada por mitógeno
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogeno
MII	metáfase II
mm	<i>Milímetro</i>
MPF	Fator Promotor de Meiose
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
PDE3A	fosfodiesterase 3ª
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
PVP	Polivinilpirrolidona
VG	vesícula Germinativa

LISTA DE SÍMBOLOS

M	molar
°C	Graus Celsius
n	Nano
+	Mais
<	menor que
μ	micro
%	porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE	23
2.2	MATURAÇÃO OOCITÁRIA.....	25
2.3	VIAS DE SINALIZAÇÃO DA RETOMADA DA MEIOSE	27
2.3.1	Gonadotrofinas	28
2.3.2	Proteína Quinase C (PKC)	31
2.3.3	Fator de Crescimento Epidermal (EGF).....	31
2.3.4	Progesterona (P4)	32
3	HIPÓTESE.....	35
4	OBJETIVOS	37
4.1	GERAL	37
4.2	ESPECÍFICOS	37
5	MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1	OBTENÇÃO DOS OÓCITOS.....	39
5.2	MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DOS OÓCITOS	39
5.3	DILUIÇÃO DO INIBIDOR DE PKC	41
5.4	AVALIAÇÃO DA EXPANSÃO DAS CÉLULAS DO <i>CUMULUS</i>	42
5.5	REMOÇÃO DAS CÉLULAS DO <i>CUMULUS</i>	42
5.6	AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR.....	42
5.7	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROGESTERONA NO MEIO DE CULTIVO.....	43
5.8	AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DA PKC.....	43
5.9	AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DA MAPK	43
5.10	WESTERN BLOT.....	44
5.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
6	RESULTADOS.....	47
6.1	A PKC ESTA ENVOLVIDA NA RETOMADA DA MEIOSE DE OÓCITOS BOVINOS	47
6.2	A PKC PARTICIPA NA EXPANSÃO DAS CÉLULAS DO <i>CUMULUS</i> MEDIADA POR ESTIMULO HORMONAL DURANTE A MATURAÇÃO	49
6.3	O EGF REESTABELECE A RETOMADA DA MEIOSE MEDIADA POR FSH/LH EM OÓCITOS BLOQUEADOS PELA INIBIÇÃO DA PKC.....	51
6.6	A PKC NÃO ESTÁ ENVOLVIDA NA PRODUÇÃO DE PROGESTERONA PELO COMPLEXO <i>CUMULUS</i> -OÓCITO.....	54
6.7	ATIVAÇÃO DA PKC E DA MAPK	56
7	DISCUSSÃO	59

8	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	69

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O Brasil figura na pecuária mundial entre um dos principais produtores de carne e de leite, destacando-se pela liderança em termos de quantidade, com cerca de 200 milhões de animais, além de estar entre os maiores exportadores de carne bovina no mundo. Apesar do quadro de destaque, a pecuária nacional enfrenta limitações quanto à produtividade com baixa taxa de desfrute do rebanho e baixos índices reprodutivos. O desempenho reprodutivo é um fator com importante impacto produtivo e econômico em rebanhos bovinos de corte e de leite, afetando diretamente o número de bezerros nascidos e a produção leiteira, respectivamente. Os esforços para aumentar a produtividade tem se apoiado na utilização das biotecnologias para melhorar as taxas reprodutivas. As diversas técnicas envolvem a manipulação do ciclo estral, a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e a manipulação de gametas, sendo que todas aportam importantes contribuições à reprodução animal.

Visando melhor compreensão dos mecanismos envolvidos em cada evento que ocorre na reprodução um número crescente de estudos tanto na área básica quanto na aplicada são realizados. O Brasil apresenta uma posição de destaque mundial dentro deste cenário, sendo um importante mercado de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATE), TE e o maior produtor de embriões do mundo, sendo a grande maioria produzida *in vitro* (PIV).

A PIV é uma biotecnologia aplicada para a produção *in vitro* de embriões que consiste na manipulação de gametas, sendo uma ferramenta importante para a reprodução assistida e para a pesquisa. A PIV de embriões engloba eventos relacionados à maturação do oócito, à capacitação do espermatozoide, à fecundação e ao cultivo dos embriões *in vitro*. O preparo dos gametas é de especial importância para o sucesso da PIV, uma vez que o espermatozoide precisa passar por alterações na estrutura da membrana, para estar capacitado e pronto a fecundar o oócito que por sua vez necessita passar pelo processo de maturação para desenvolver a competência necessária antes da fecundação. Esta competência oocitária envolve mudanças nucleares e citoplasmáticas na célula e expansão das células do cumulus. Estas alterações são necessárias para uma fecundação adequada e desenvolvimento embrionário. Uma melhor compreensão destes mecanismos é essencial para a aplicação na maturação *in vitro*, sendo possível proporcionar melhores condições de cultivo e melhor qualidade das estruturas resultantes deste processo, que serão utilizados em tecnologias como a PIV de embriões. Embora se tenha conhecimento dos processos ocorridos durante a meiose, muito pouco se sabe sobre as vias pelas quais esses processos são regulados. A maturação

nuclear envolve a retomada da meiose do oócito, bloqueado no estágio de diplóteno I da meiose. O primeiro passo para que a maturação nuclear ocorra é a quebra da vesícula germinativa. Este evento é induzido por gonadotrofinas, controlado por uma cascata de fosforilação e desfosforilação de proteínas e a regulação desta cascata se dá pelas proteínas quinases e proteínas fosfatases.

A identificação de moléculas e vias candidatas envolvidas na competência oocitária é um passo importante para a compreensão da complexa via de maturação e aquisição de competência do oócito, e aporta informações fundamentais para a técnica de PIV. Assim, o presente estudo buscou avaliar a participação das gonadotrofinas e a participação de proteínas, visando elucidar parte dos eventos ocorridos durante a maturação oocitária.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

A gametogênese é um processo sofisticado pelo qual o número de cromossomos de cada espécie é mantida. A oogênese é a formação do gameta feminino.

2.1 OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

O gameta feminino origina-se a partir das células germinativas primordiais durante o desenvolvimento fetal. Reconhecidas inicialmente entre as células hipoblásticas, as células germinativas primordiais migram até serem incorporadas às gônadas fetais em formação no mesonefro do corpo embrionário. Em bovinos, as cristas gonadais se desenvolvem por volta dos dias 28 a 32 da gestação e são povoadas pelas células germinativas primordiais entre os dias 30 e 64. Durante a migração para as gônadas, as células germinativas primordiais seguem se multiplicando por divisão mitótica (AERTS; BOLS, 2010a). Após a migração das células germinativas, o contato destas com o tecido somático das gônadas é essencial. Em mamíferos, o desenvolvimento, a diferenciação e a sobrevivência das células germinativas primordiais são controlados por fatores genéticos e epigenéticos e regulados por uma combinação de diferentes fatores de crescimento (VIRANT-KLUN; STIMPFEL; SKUTELLA, 2011) e sinais vindos de células vizinhas que monitoram a diferenciação das células germinativas primordiais em oogônias (MARSTON; AMON, 2004).

Nichos de células germinativas são formados e consistem de oogônias circundadas por células somáticas, sendo estas consideradas precursoras das células da granulosa (AERTS; BOLS, 2010a). Quando diferenciadas em oôgonias, estas células se proliferam por mitoses sucessivas. A sinalização para a célula entrar em meiose é coordenada por genes presentes nas oôgonias previamente à replicação do DNA na Fase S do ciclo celular em camundongos (BALTUS et al., 2006). A replicação do DNA é desencadeada por proteínas quinases ciclina-dependentes (MARSTON; AMON, 2004), conduzindo a oogônia ao ciclo meiótico até o estágio de diplóteno dando origem aos oócitos primários (AERTS; BOLS, 2010a). Ainda no desenvolvimento fetal, o número de oócitos é reduzido significativamente pelo mecanismo de apoptose e estabelece o número de oócitos de uma fêmea ao longo de sua

vida, fenômeno que parece ser equivalente para todas as espécies (VASKIVUO; ANTTONEN; HERVA; 2001)

Na maioria dos mamíferos, quando o oócito alcança o estágio de diplóteno, mecanismos não completamente conhecidos conduzem o oócito a um bloqueio meiótico que é mantido até momentos antes da ovulação. O cromossomo se dispersa no núcleo e a transcrição é retomada. Logo após a entrada da meiose, os nichos celulares são desfeitos. Os oócitos são circundados por uma camada de células achatadas da pré-granulosa e uma lâmina basal é depositada na superfície, formando o folículo primordial (AERTS; BOLS, 2010a). O desenvolvimento folicular segue com a transição do folículo primordial para folículo primário, circundado agora por células cubóides, as células da granulosa. No desenvolvimento dos folículos primários em camundongos, os oócitos permanecem no estágio de diplóteno e são meioticamente incompetentes, provavelmente devido à ausência ou aos níveis basais de componentes necessários para a ativação do fator promotor de maturação (MPF) (KANATSU-SHINOHARA; SCHULTZ; KOPF; 2000). Altos níveis de Adenosina Monofosfato Cíclico (cAMP) no oócito são responsáveis pela regulação do bloqueio meiótico (CONTI et al., 2002). A guanosina monofosfato cíclico (cGMP) também é um importante inibidor de sinal para a maturação do oócito e está presente nas células da granulosa (SUN; MIAO; SCHATTEN, 2009). A extensiva fase de desenvolvimento do folículo primário segue com a proliferação das células da granulosa aumentando o número de camadas que circundam o oócito e formando o folículo secundário (EPPIG, 2001). Nesta fase, as células da teca são reconhecidas como células alongadas, originárias das células mesenquimais do estroma ovariano bovino (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1996).

Na fase de folículos primário e secundário, o desenvolvimento não depende da ação de gonadotrofinas, apesar de responder ao estímulo destes hormônios, principalmente o FSH (CORTVRINDT; SMITZ; STEIRTEGHEM, 1997), uma vez que as células da granulosa já apresentam receptores para este hormônio (FINDLAY; DRUMMOND, 1999). A fase subsequente engloba o crescimento do oócito, a replicação das células foliculares e a formação e expansão de uma cavidade, ou antro folicular central. A expansão das células e a formação do antro são, provavelmente, estimuladas pelos mesmos hormônios (RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010).

Nos mamíferos, o crescimento final do folículo pré ovulatório é necessariamente dependente de FSH e parece coincidir com a proliferação das células da granulosa com consequente discriminação anatômica e funcional entre as células do *cumulus* e da granulosa mural (RICHARDS, 2001; GILCHRIST; LANE; THOMPSON, 2008;). As células da

granulosa facilitam o transporte do oócito no oviduto e controlam os mecanismos complexos da interação entre os gametas (MOHAN; THIRUMALAPURA; MALAYER; 2003). Parte das células da granulosa, altamente especializadas, constitui a corona radiata e possui processos citoplasmáticos que penetram a zona pelúcida e se aderem à membrana do oócito formando o Complexo *Cumulus* Oócito (CCO) (ALBERTINI et al., 2001). Junções *gap* presentes no final destes processos permitem a transferência de moléculas de pequeno peso molecular entre os oócitos e as células da granulosa e também entre essas. As moléculas transferidas através das junções *gap* incluem íons, metabólitos e aminoácidos necessários ao crescimento do oócito, bem como moléculas reguladoras que controlam desenvolvimento (GILCHRIST, R B; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, 2004).

O fluido folicular é formado possivelmente a partir do fluxo sanguíneo dos capilares da região tecal. Um aumento na pressão e na permeabilidade destes, por mecanismos desconhecidos promove o extravasamento de fluido e o acúmulo deste dentro do antro folicular (CAVENDER; MURDOCH, 1988). De fato a composição do fluido folicular se assemelha com o plasma em relação às moléculas de baixo peso molecular (até 100kDa) (GOSDEN et al. 1988), o que sugere a presença de uma barreira hemato – folicular, presente provavelmente na lâmina basal folicular e nos capilares da teca (ZHOU; OHNO; TERADA; 2006). Esta barreira pode existir no sentido inverso também, na qual grandes moléculas secretadas pelo oócito e pelas células da granulosa não atravessam a membrana e estabelecem gradiente osmótico. A diferença de osmolaridade parece ser responsável por recrutar fluido para o centro do folículo (RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010). Após o desenvolvimento do antro, a presença das gonadotrofinas é obrigatória para a continuidade do crescimento do folículo (KNIGHT; GLISTER, 2001). A complexa cascata de eventos no desenvolvimento folicular inclui a produção e a secreção de fatores ovarianos moduladores da ativação das gonadotrofinas em nível celular (AERTS; BOLS, 2010a).

2.2 MATURAÇÃO OOCITÁRIA

Durante o desenvolvimento do folículo antral, o oócito alcançará a competência necessária para o desenvolvimento e para retomar a meiose de forma gradual e progressiva (GILCHRIST, R B; NAYUDU, P. L.; HODGES, 1997). Nesta etapa adquire maquinaria molecular e citoplasmática requerida para o desenvolvimento embrionário (SIRARD;

DESROSIER; ASSIDI, 2007) processo denominado de maturação. A maturação oocitária envolve alterações nucleares, citoplasmáticas e moleculares.

A maturação nuclear compreende a reversão do primeiro bloqueio meiótico do oócito, na prófase I, havendo condensação gradual da cromatina, desaparecimento do nucléolo e desintegração da membrana nuclear. Segue-se a meiose até o segundo bloqueio meiótico, na metáfase II, quando ocorre a expulsão do primeiro corpúsculo polar, permanecendo nesta fase até a fecundação (KISHIMOTO, 2003). A maturação citoplasmática é mais complexa de se definir. Durante a maturação citoplasmática ocorrem mudanças ultraestruturais, com proliferação e redistribuição das organelas, incluindo a migração dos grânulos corticais para a periferia da célula e reposicionamento das mitocôndrias, mudanças que permitem que a fecundação ocorra (SIRARD 2001; CARNEIRO et al., 2002). Outro aspecto da maturação envolve acúmulo de mRNA específicos e síntese proteica. Estas mudanças fornecerão ao oócito elementos necessários para a fecundação e desenvolvimento embrionário subsequente até a ativação do genoma embrionário. Desta forma, o mRNA deve ser rapidamente traduzido em proteínas, sofrer alterações nas extremidades 5' e 3', ou alterações no grau de poliadenilação, que o torne mais estável e então possa ser armazenado (SOMMERVILLE; LADOMERY, 1996).

A maturação ocorre com interação entre o oócito e as células do *cumulus*, as quais irão fornecer nutrientes, fatores para o desenvolvimento do oócito e o microambiente necessário para garantir o sucesso na maturação (EPPIG, 2001; GILCHRIST; LANE; THOMPSON, 2008). Da mesma forma, a matriz extracelular, a diferenciação, a expressão gênica, a ativação metabólica e a esteroidogênese nas células do *cumulus*, durante o estágio pré ovulatório é coordenado pelo oócito (LUCIDI; DIELEMAN; SIRARD, 2003; SU et al., 2008). Portanto, a comunicação e as trocas entre o oócito e as células do *cumulus* são fatores essenciais para o sucesso na maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário precoce (ASSIDI; DIELEMAN; SIRARD, 2010). *In vivo*, a retomada da meiose ocorre apenas sob o estímulo de gonadotrofinas, enquanto que, quando removido do folículo (na aspiração, por exemplo), o oócito retoma a meiose espontaneamente (MAYES; SIRARD, 2001).

2.3 VIAS DE SINALIZAÇÃO DA RETOMADA DA MEIOSE

A maturação oocitária necessita de uma integrada via de sinalização endócrina, parácrina e autócrina (SU et al., 1999), e uma interação mútua entre o oócito e as células foliculares que são responsáveis por promover o desenvolvimento do oócito (BUCCIONE et al., 1990).

Em camundongos, a sinalização para a manutenção do bloqueio meiótico se dá pelos altos níveis de cAMP no oócito. Há conflitos entre a origem do cAMP no oócito. Tsafiriri et al., (1996) sugerem que o cAMP seja transferido das células do *cumulus* via junções *gap* para o oócito. Os receptores acoplados à proteína G (GPR3) ativados constitutivamente ou por ligantes desconhecidos, estimulam a enzima adenilato ciclase aumentando os níveis de cAMP no oócito, mas não se sabe se o oócito é capaz de produzir cAMP suficiente para manter o oócito em meiose (CONTI et al., 2002). O cAMP ativa a proteína quinase A (PKA), a qual promove a fosforilação do complexo CDK1/Ciclina B e inativa o Fator Promotor de Meiose (MPF) (Figura 1), mantendo o bloqueio meiótico (MEHLMANN, 2005). A guanosina mono fosfato (cGMP) passa das células do *cumulus* para o oócito via junção *gap* e impede a hidrólise do cAMP pela enzima fosfodiesterase PDE3A, mantendo os altos níveis de cAMP e inibindo a retomada da meiose (NORRIS et al., 2009). O aumento da ativação do MPF está associado com a quebra da vesícula germinativa. A diminuição do cAMP no início da maturação oocitária, induzida por gonadotrofinas, desencadeia a desfosforilação do CDK1, tornando o MPF ativo (MEHLMANN, 2005). As proteínas quinases e fosfatases desenvolvem um papel vital na regulação da ativação do MPF, agindo diretamente nas subunidades ou em uma região acima da cascata de ativação do MPF (DOWNS; COTTOM; HUNZICKER-DUNN, 2001).

O aumento da concentração de cAMP nas células da granulosa estimulado pelas gonadotrofinas para a retomada da meiose parece ser um paradoxo. No entanto, apesar da presença de junções *gap*, as células da granulosa e o oócito atuam como dois compartimentos separados em relação cAMP, sendo que um aumento no cAMP nas células somáticas é de alguma maneira traduzido em diminuição nos níveis de cAMP no oócito (CONTI et al., 2002).

Figura 1 – Regulação do bloqueio meiótico em mamíferos

Legenda: O cAMP é produzido endogenamente no oócito através da proteína Gs G estimulada pelo receptor GPR3, transferido ao oócito pelas células do *cumulus* adjacentes ao oócito e/ou mantido pela inibição da PDE3A no ambiente folicular. Proteína quinase dependente de cAMP regula a atividade do MPF pela fosfatase CDC 25 e a quinase Wee1/Myt1: cDC25 desfosforila a CDK1, e a Wee1/Myt a desfosforile. Altos níveis de cAMP resultam na fosforilação do CDK1 e do complexo MPF, CDK1/Ciclina B (CyB), tornando-o inativo e mantendo o oócito bloqueado em estágio de vesícula germinativa. cAMP, adenosina monofosfato; GPR3, Receptor acoplado à proteína G; PDE3A, fosfodiesterase 3ª; PKA, proteína quinase A; CDK1 quinase dependente de ciclina; MPF, fator promotor de maturação.

Fonte- Zhang, Ouyang e Xia, 2009.

2.3.1 Gonadotrofinas

As concentrações periféricas das gonadotrofinas são mantidas por um balanço entre o estímulo do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) e o estímulo ou a inibição dos hormônios esteroides (estrógeno e progesterona) e fatores ovarianos (BADINGA; SAVIO, 1992). A ação das gonadotrofinas na maturação do oócito se dá pelo estímulo dos receptores das células do folículo, (CHEN et al., 2008), uma vez que os oócitos não apresentam receptor para estes hormônios (BYSKOV, et al., 2002; ZHANG; OUYANG; XIA, 2009). As gonadotrofinas estimulam as células somáticas a produzir fatores que são essenciais para o crescimento completo e a maturação do oócito (SIRARD; DESROSIER; ASSIDI, 2007).

O FSH e o LH são hormônios glicoproteicos secretados pelo lobo anterior da pituitária em resposta ao GnRH. Os receptores para o FSH e o LH pertencem ao grupo dos receptores acoplados à proteína G (SHAUGHNESSY; DUDLEYB, 1996) expressos na

membrana celular. Os receptores para FSH são expressos já na fase de folículo pré antral (FINDLAY; DRUMMOND, 1999) e os receptores de LH tem expressão induzida pela ação do FSH nas células da granulosa (ADRIAENS; CORTVRIND; SMITZ, 2004). A ligação entre os hormônios e respectivos receptores específicos ocorre na superfície da membrana das células alvo. De modo geral, uma vez ligado ao receptor, o hormônio ativa a enzima adenilato ciclase por meio da proteína G, iniciando a cascata de eventos que desencadeiam a retomada da meiose (DOWNS; CHEN, 2008). A enzima ativada irá converter o ATP em cAMP no citoplasma, o qual ativará a família de proteínas quinases. As proteínas quinases são responsáveis por ativar enzimas que irão participar da síntese de novos produtos a serem secretados e utilizados nos eventos seguintes (JOHNSON; DHANASEKARAN, 1989). As quinases como o MPF e a MAPK são moléculas chaves na retomada da meiose e a ativação destas moléculas é essencial para a retomada da meiose induzida por gonadotrofinas (FAN; SUN, 2004).

Quando as gonadotrofinas aumentam os níveis de cAMP nas células da granulosa, ativam a MAPK, a qual conduzirá o oócito à retomada da meiose (ZHANG; OUYANG; XIA, 2009). Embora não seja necessária para a quebra da vesícula germinativa, existem evidências de que o aumento da ativação da MAPK acelera a quebra da vesícula. Além disso, a ativação precoce da MAPK pode conduzir à ativação do MPF (FAN; SUN, 2004), embora o MPF possa ser ativado por mecanismos MAPK-independentes (LIANG et al., 2007).

Hormônio Folículo Estimulante (FSH)

Durante o ciclo estral, o FSH atua nas etapas de recrutamento, seleção e dominância folicular, sendo os níveis controlados pelo número de ondas de crescimento de cada indivíduo (AERTS; BOLS, 2010b). O FSH altera a expressão gênica das células do *cumulus*, induzindo a proliferação e a diferenciação destas (SÁNCHEZ et al., 2010), bem como induz a expansão das células do *cumulus* (DELL'AQUILA; CAILLAUD; MARITATO, 2004). Em cultivo de folículos pré-antrais de suínos, o FSH se mostrou essencial para o crescimento, a formação do antro destes folículos, na esteroidogênese, na competência do oócito em retomar a meiose e ser fecundado e posteriormente para o desenvolvimento embrionário (WU; TIAN, 2007), modulando o desenvolvimento da

competência oocitária. O FSH é essencial na indução dos receptores do LH (SUN; MIAO; SCHATTEN, 2009).

Estudos utilizando gonadotrofinas purificadas e envolvendo animais *knockout* demonstraram que o FSH é o responsável pelo crescimento do folículo antral *in vivo*, no entanto, os mecanismos pelo qual o FSH age nos folículos pré-antrais ainda são desconhecidos (ADRIAENS; CORTVRINDT; SMITZ, 2004). Nos folículos em desenvolvimento, o FSH se liga ao receptor, alterando sua conformação e ativando a subunidade reguladora da adenilato ciclase via guanina, promovendo o aumento do cAMP nas células da granulosa (ZHANG; OUYANG; XIA, 2009).

Fan e Sun (2004) observaram que o FSH estimula a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) em camundongos. Também estimula a hidrólise do fosfoinositol bifosfato por meio da fosfolipase C. Dois produtos são gerados a partir desta hidrólise: o diacilglicerol (DAG) e o inositol trifosfato (IP3), que irá ativar a proteína quinase C (PKC).

Hormônio Luteinizante (LH)

In vivo, a retomada da meiose se dá quando ocorre o pico de LH, concomitante com a ovulação. A diminuição da concentração de cAMP no oócito está associada ao pico ovulatório do LH (FAN; SUN, 2004). O LH possivelmente age na retomada da meiose por remover uma substância inibidora ou bloqueadora da retomada da meiose, ou ativar uma substância promotora da maturação. As duas vias parecem ser verdadeiras. (MEHLMANN, 2005).

Uma das vias da qual o LH participa na retomada da meiose é na ativação de receptores de EGF, os quais fecham as junções *gap* através da fosforilação das conexinas interrompendo o fluxo de moléculas entre as células da granulosa e o oócito (NORRIS et al., 2010). Além disso, o LH diminui as concentrações de cGMP nas células somáticas diminuindo o influxo desta molécula para dentro do oócito ativando a enzima fosfodiesterase 3A (PDE3A) e diminuindo os níveis de cAMP (NORRIS; RATZAN; FREUDZON, 2009). A sinalização do LH reflete principalmente nas células da teca e da granulosa mural, as quais podem transmitir um sinal secundário às células do *cumulus* e induzir vários eventos na maturação (RUSSELL; ROBKER, 2007).

2.3.2 Proteína Quinase C (PKC)

A ação do FSH sobre a retomada da meiose se dá, possivelmente, por ativação da proteína quinase C. A via de sinalização desta proteína parece estar envolvida na ativação da quinase ativada por mitógeno (MAPK) em oócitos e células do *cumulus*, na maturação induzida por FSH e LH, além de regular a síntese de EGF (SU et al., 1999; DOWNS; COTTOM; HUNZICKER-DUNN, 2001;). Ativadores de PKC induzem a maturação oocitária, assim como os inibidores de PKC inibem a ativação da MAPK induzida por FSH e, consequentemente, desencadeiam a maturação (SU et al., 1999; FAN; SUN, 2004)

Downs e Chen (2008) demonstraram que a ativação da PKC em oócitos de camundongos promoveu a quebra da vesícula germinativa, enquanto a inibição bloqueou o efeito do FSH na indução da meiose. Embora a PKC exerça papel importante na maturação oocitária, a real via de sinalização ainda não está completamente compreendida. Estudos demonstram que a ativação da PKC pode mediar a síntese de EGF e ativar MAPK. Na cascata de maturação o EGF regula a produção e a ativação de progesterona, possivelmente envolvida na maturação do oócito, bem como na ativação do MPF.

2.3.3 Fator de Crescimento Epidermal (EGF)

O EGF é um fator de crescimento polipeptídico que exerce função biológica via receptor (EGFR) presente na membrana (ANAS; SHIMADA; ZENG, 2000).

A maturação de oócitos suínos induzida por EGF promove a fosforilação da MAPK (LIANG et al., 2007), indicando que a maturação induzida por gonadotrofinas ocorre por ação do EGFR e da MAPK (CHEN et al., 2008). Por sua vez, a ativação do EGFR parece ser regulada pela ativação da PKC (DOWNS; CHEN, 2008)

Estudos demonstram que o LH e o FSH estimulam maior expressão dos fatores EGF e *EGF-like* e também a expansão das células do *cumulus* por via parácrina, os quais seriam responsáveis pela retomada da meiose em oócitos de camundongos (PARK et al., 2004). O EGF e os fatores de crescimento EGF-Like também regulam a ativação de MAPK, ao se ligarem aos receptores de EGF (EGFR) e a inibição do EGFR bloqueia a retomada da meiose induzida por LH e FSH (PARK et al., 2004; CHEN et al., 2008)

Tem sido demonstrado que a inibição do EGFR reprimiu a retomada da meiose mediada pela ativação da PKC, sugerindo que a PKC participa da maturação oocitária por meio da ativação do EGFR (CHEN et al., 2008). Quando os oócitos foram estimulados à maturação com ativadores de PKC, o AG1478, um inibidor do receptor de EGF, impediu a indução meiótica, tendo um efeito similar com o anticorpo anti-EGFR. Estes resultados sugerem que a PKC pode mediar o efeito estimulante do FSH sobre a síntese de EGF. Possivelmente, há necessidade da ativação do EGFR para a retomada da meiose (MANNA; HUHTANIEMI; STOCCO, 2009). Somando-se à necessidade desta ativação para a retomada da meiose, o EGFR é também requerido para a esteroidogênese a partir da indução de LH. Entre outras coisas, o EGFR regula a produção de progesterona pelas células do *cumulus* (ZHANG; OUYANG; XIA, 2009).

2.3.4 Progesterona (P4)

A produção de progesterona se dá em maiores proporções nas células do *cumulus* do que nas células da granulosa (ARMSTRONG et al., 1996). Jamnongjit et al. (2005) sugeriram a participação da progesterona na regulação da maturação de oócitos induzida por gonadotrofinas.

Como a progesterona pode desencadear a retomada da meiose em oócitos desnudos (GILL; JAMNONGJIT; HAMMES, 2004), a maturação do oócito com a participação do EGFR pode envolver a progesterona.(ZHANG; OUYANG; XIA, 2009).

As gonadotrofinas atuam em seus receptores nas células do *cumulus*, nas quais ativam a sinalização celular por mensageiros secundários. As fosforilações e desfosforilações sequentes ativam as vias pelas quais a maturação do oócito. A PKC participa deste processo em várias espécies e parece ser ativada pelas gonadotrofinas. Na via em que a PKC está envolvida, ela ativa o EGF que por sua vez resulta na ativação da MAPK, conduzindo à quebra da vesícula germinativa e retomada da meiose (Figura 2). Deste modo, pretendeu-se com o presente trabalho avaliar a ação da PKC na maturação de oócitos bovinos e se esta ativação envolve o EGF.

The diagram illustrates the signaling pathways in theca cells. The theca cells are represented by a ring of cells surrounding a central area. Gonadotropins (LH/FSH) bind to receptors on the theca cells, activating EGFR and PI3K/PKB. EGFR activates EGF-like factors, pre-EGF-like factors, and the Cre-gene, which leads to PKC and PKAII. PI3K/PKB activates Sterols & Steroids. Both PKC and PKAII lead to CREB. CREB and Sterols & Steroids lead to MAPK. MAPK activates Cx-43 and PKG. PKG activates GC, which produces cGMP. cGMP activates PKG. PKG also activates PDE3. PDE3 inhibits MPF. MPF inhibits GVBD. GVBD inhibits Cx-43. Cx-43 inhibits MPF. The diagram also shows the production of NO by iNOS and NP, which inhibits GC. The diagram is labeled "Theca cells" and "Gonadotropins (LH/FSH)".

Fonte; Zhang, Ouyang e Xia, 2009.

Hipótese

3 HIPÓTESES

A PKC é ativada por gonadotrofinas (FSH e LH).

A PKC regula a retomada da meiose através do EGF.

Objetivos

4 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são apresentados a seguir.

4.1 GERAL

Avaliar o papel da PKC na maturação de oócitos bovino.

Verificar se a ativação desta proteína na maturação envolve o EGF.

4.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar se a ativação da PKC durante a maturação de oócitos bovinos é regulada pelo FSH e/ou LH.
- Avaliar se a ativação da PKC induzida por gonadotrofinas na maturação de oócitos bovinos envolve o EGF.
- Avaliar se a PKC e o EGF ativam a MAPK.

Material e Métodos

5 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados foram obtidos da Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Os meios de cultura de tecido (TCM – 199) e o soro fetal bovino foram obtidos da Gibco BRL (Grand Island, NY, USA).

5.1 OBTENÇÃO DOS OÓCITOS

Os ovários foram obtidos de fêmeas bovinas abatidas em frigorífico comercial, localizado na cidade de Piracicaba, São Paulo, Brasil e transportados em recipiente térmico com solução fisiológica estéril (Anexo A) a 37°C. No laboratório, os ovários foram lavados em solução fisiológica estéril a 37°C, contendo gentamicina, na concentração de 50µg/ml. Os folículos com diâmetros de 2 a 8 mm foram aspirados com o auxílio de agulha 21 G (0,80x25 mm) conectada a uma seringa estéril descartável de 5 ml. O líquido folicular obtido na aspiração foi depositado em tubos cônicos de 15 ml, mantido em banho maria a 37°C, onde permaneceram em repouso por 10 minutos para sedimentação dos complexos cumulus oophorus (CCOs). Após esse período, o sedimento foi transferido com auxílio de pipeta Pasteur para um filtro de nylon de 100 µm. O filtro foi lavado várias vezes com meio de coleta de oócitos (Anexo B) e o material retido transferido para placa de petri de 100 mm, para recuperação e posterior avaliação e seleção dos oócitos em microscópio estereoscópio.

5.2 MATURAÇÃO *IN VITRO* DOS OÓCITOS

Os oócitos recuperados, classificados como grau I e II (contendo três ou mais camadas compactas de células do cumulus oophorus e citoplasma homogêneo) foram lavados três vezes em meio de lavagem (Anexo C), seguido de três lavagens em meio de maturação (Anexo A).

Após as lavagens, 30 oócitos foram transferidos em gotas de 90 µl de meio de maturação, distribuídos conforme os tratamentos, de acordo com o delineamento dos

experimentos 1 e 2, (Quadros 1 e 2). A maturação *in vitro* foi realizada por 24 horas, a 38,5° C em atmosfera de 5% de CO₂ em ar e alta umidade.

5.2.1 Experimento 1- Avaliação da ativação da PKC por gonadotrofinas

Para todos os tratamentos, o meio base foi o TCM 199 Bicarbonato suplementado com 10% (v/v) de SFB, 22 µg/ml de piruvato (v/v), 50 µg/ml de gentamicina e 1 µg/ml de E₂ (Anexo D).

No tratamento 1, os oócitos não receberam suplementação além da descrita. No tratamento 2, os oócitos foram suplementados com FSH 1 mg/ml e LH.10 mg/ml. No tratamento 3, os oócitos foram suplementados somente com LH. No tratamento 4, os oócitos foram suplementados com LH e o inibidor de PKC “Bisindolylmaleimide I” (BIM). No tratamento 5, os oócitos foram suplementados com FSH e com o inibidor da PKC BIM. No tratamento 6, os oócitos foram suplementados somente com FSH. No tratamento 7, os oócitos foram suplementados com FSH, LH e inibidor da PKC BIM. No tratamento 8, os oócitos foram suplementados somente com inibidor de PKC. Após a maturação, os oócitos foram fotografados para avaliação da expansão das células do *cumulus* (N= 5réplicas utilizando 60/75 CCOs/tratamento, total 523 CCOS), denudados para avaliação da progressão celular (N= 5réplicas utilizando 24/54 CCOs/tratamento, total 339 CCOS), as gotas de meio de cultivo foram armazenadas em *freezer* -20°C (N= 5 réplicas), e as células do *cumulus* de 20 oócitos foram colocadas em tampão de *Laemmli*, (N= 5réplicas) para avaliação da ativação da PKC.

Quadro 1 – Delineamento experimental dos tratamentos utilizados no Experimento 1

Tratamento	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8
FSH	-	+	-	-	+	+	+	-
LH	-	+	+	+	-	-	+	-
BIM	-	-	-	+	+	-	+	+

5.2.2 Experimento 2 – Avaliação do envolvimento do EGF na maturação de oócitos bovinos

Para todos os tratamentos, o meio base foi o TCM 199 Bicarbonato suplementado com 10% (v/v) de SFB, 22 µg/ml de piruvato (v/v), 50 µg/ml de gentamicina e 1 µg/ml de E₂.

No tratamento 1, os oócitos não receberam suplementação além da descrita. No tratamento 2, os oócitos foram suplementados com FSH, LH e EGF. No tratamento 3, os oócitos foram suplementados somente com EGF. No tratamento 4, os oócitos foram suplementados com EGF e o inibidor de PKC BIM. No tratamento 5, os oócitos foram suplementados com LH e FSH e inibidor da PKC BIM. No tratamento 6, os oócitos foram suplementados com LH e FSH. No tratamento 7, os oócitos foram suplementados com FSH, LH, EGF e inibidor da PKC BIM. No tratamento 8, os oócitos foram suplementados somente com inibidor de PKC BIM. Após a maturação, os oócitos foram fotografados para avaliação da expansão das células do *cumulus* (N= 5réplicas utilizando 55/68 CCOs/tratamento, total 512 CCOS), denudados para avaliação da progressão celular (N= 5réplicas utilizando 28/68 CCOs/tratamento, total 367 CCOS), as gotas de meio de cultivo foram armazenadas em *frezer* -20°C (N= 5 réplicas), 20 oócitos foram colocadas em tampão de *Laemmli*, (N= 5réplicas) para avaliação da ativação da PKC.

Quadro 2 – Delineamento experimental dos tratamentos utilizados no Experimento 2

Tratamento	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8
FSH/LH	-	+	-	-	+	+	+	-
EGF	-	+	+	+	-	-	+	-
BIM	-	-	-	+	+	-	+	+

5.3 DILUIÇÃO DO INIBIDOR DE PKC

O inibidor de PKC “Bisindolylmaleimide I” (BIM) foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 10 mM. Após diluição, o inibidor foi aliqotado em tubos de microcentrífuga e armazenado a -20° C, até o uso.

5.4 AVALIAÇÃO DA EXPANSÃO DAS CÉLULAS DO *CUMULUS*

Após a maturação, os oócitos de ambos os experimentos foram fotografados em microscópio Olympus IX81. As imagens foram analisadas pelo software Image Pro Plus 5.1 e a expansão das células do *cumulus* mensurada pelo maior diâmetro de cada complexo cumulus oócito em pixels.

5.5 REMOÇÃO DAS CÉLULAS DO *CUMULUS*

Ao término da maturação, as células do *cumulus* foram removidas mecanicamente com auxílio de uma pipeta automática, em meio PBS (Anexo E) com polivinilpirrolidona PVP 1%.

5.6 AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR

A avaliação da progressão do ciclo celular foi feita para os oócitos dos experimentos 1 e 2, utilizando a sonda fluorescente Hoechst 33342 (Anexo G).

Os oócitos desnudos foram incubados em gotas de 50 µl contendo 5 µg/ml de Hoechst 33342 em 10 mM de PBS (tampão fosfato-salino) (Anexo H) por 15 minutos, a temperatura ambiente e no escuro. Os oócitos foram lavados 3 vezes em gotas de 50 µl de PBS contendo 1 mg/ml de PVP (polivinilpirrolidona) (PBS-PVP) (Anexo F). Os oócitos foram colocados em 10 µl de PBS-PVP sobre lâmina. A lamínula foi previamente marcada com parafina nas suas extremidades e as estruturas comprimidas entre a lâmina e a lamínula com uma leve pressão nas extremidades da lamínula. A leitura foi realizada em microscópio de epifluorescência Olympus IX81 equipado com filtros FITC (Isoticianato de Fluoresceína), TEXAS RED e DAPI.

5.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROGESTERONA NO MEIO DE CULTIVO

Após o período de 24 horas de maturação dos oócitos, 90 µl do meio de cada tratamento foram removidos e congelados -20°C. Posteriormente, as amostras foram enviadas para o laboratório do prof. Alexandre Vaz Pires, do Departamento Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luís de Queiróz” (ESALQ) da Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, onde foram analisadas por radio imuno ensaio (RIA). Foram seguidos os protocolos utilizados no laboratório, que estão brevemente descritos nos trabalhos de Reimers; Salerno; Lamb (1996) e Krueger; Heuwieser (2010).

5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DA PKC

A ativação da PKC foi avaliada pela massa de PKC fosforilada em relação à massa de PKC total, avaliada pela técnica de western blot. Para a obtenção dos dados foram utilizadas as células do cumulus de 20 oócitos de cada tratamento, sendo adotado este procedimento para ambos os experimentos (1 e 2).

5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DA MAPK

A ativação da MAPK foi avaliada pela massa de MAPK fosforilada em relação à massa de MAPK total, avaliada pela técnica de western blot. Para esta avaliação foram utilizados 20 oócitos de cada tratamento de ambos os experimentos descritos anteriormente.

5.10 WESTERN BLOT

As células do cumulus, coletadas durante cada manipulação de maturação *in vitro*, foram colocadas em tampão *Laemmli* (Anexo I), até procedimento de leitura e análise, ficando armazenadas a -20°C.

As amostras foram fracionadas eletroforéticamente em gel descontínuo de poliacrilamida a 10% (Anexo J). O fracionamento foi realizado em cuba de eletroforese Bio-Rad durante 120 minutos, em tampão de corrida (Anexo J), em tensão de 160 volts. Após a eletroforese, o gel foi equilibrado em tampão de transferência (Anexo K) e submetido à transferência de proteínas para uma membrana de nitrocelulose. Utilizou-se membrana de nitrocelulose Whatman Protran NBA 085C para a transferência úmida, realizada em cuba de transferência Bio-Rad, durante 120 minutos, em corrente de 300 mA. Após a transferência a membrana foi submetida ao bloqueio de ligações inespecíficas sendo utilizado solução de TBS contendo 0,1% de tween e 5% de leite desnatado (Anexo L) por 120 minutos.

A membrana foi então lavada em TBS-tween-20 (0,1% v/v) – TBST, quatro vezes por 10 minutos (Anexo M). A incubação com o anticorpo primário foi feita por 12 horas, usando-se os anticorpos anti-phospho PKC (Rabbit polyclonal to PKC (phospho T497) ABCAM); anti-phospho MAPK (Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP[®] Rabbit mAb #4370 – Cell Signaling), anti- PKC (Mouse monoclonal [MC5] to PKC AB31 – ABCAM) e anti-MAPK (p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Rabbit mAb (HRP Conjugate) #4348), todos na diluição de 1:1000 em TBS-T e 5% leite, a 4° C, sob agitação constante. Posteriormente a membrana foi lavada com TBST, quatro vezes por 10 minutos. Após as lavagens as membranas foram incubadas em anticorpo secundário de ovelha, anti – rabbit 1:5000 (anticorpo primário anti phospho PKC e anti phospho MAPK), e anticorpo secundário de coelho anti mouse 1:5000 (anticorpo primário anti PKC) por 60 minutos. Nova lavagem foi realizada em TBST, quatro vezes por 10 minutos.

As amostras foram então incubadas em solução quimioluminescente SuperSignal[®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate na diluição 1:1, por 1 minuto. A membrana então foi exposta à captação de quimioluminescência em aparelho GBox Syngene, interpretada pelo software GeneSnap, Versão 7.09. A quantificação de proteínas foi realizada pelo do software GeneTools Versão 4.01.

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de maturação nuclear estão expressos em porcentagem, os da expansão das células do *cumulus* em pixel e os da progesterona em ng/ml. Os dados foram avaliados pelo software SigmaPlot versão 12.2. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk). Para comparação entre dois grupos, estes foram comparados pelo t-test. Para mais de dois grupos, os dados foram submetidos ao one way anova e comparados pelo teste de Tukey. Foi considerada diferença estatística quando $p < 0,05$.

Resultados

6 RESULTADOS

6.1 A PKC ESTÁ ENVOLVIDA NA RETOMADA DA MEIOSE DE OÓCITOS BOVINOS

Um dos principais eventos que ocorre no início da maturação é a retomada da meiose. Para avaliar o envolvimento da PKC neste evento, oócitos bovinos foram maturados sem estímulo hormonal (controle) ou estimulados com FSH, LH ou a associação de ambos os hormônios (FSH/LH), na presença ou não do inibidor de PKC “Bisindolylmaleimide I” (BIM).

Após 24 horas de maturação *in vitro*, a avaliação da progressão do ciclo celular dos oócitos foi realizada com a sonda fluorescente Hoechst 33342 em microscópio de fluorescência (Figura 2B). Os dados revelaram que oócitos maturados sem estímulo hormonal retomaram a meiose espontaneamente (94,46%), bem como os oócitos estimulados por LH (80,71%), FSH/LH (77,67%) ou FSH (76,01%), não havendo diferença estatística entre esses grupos.

A inibição da PKC na maturação oocitária induzida por LH ou FSH/LH diminuiu significativamente ($p < 0,01$) a porcentagem de oócitos que sofreram quebra da vesícula germinativa (38,58% e 54,12%, respectivamente) quando comparados aos oócitos em que a ativação de PKC não foi inibida pelo BIM (Figura 3I). Entretanto, não foi observado efeito do tratamento com BIM na retomada da meiose de oócitos estimulados pelo FSH (59,98%) (Figura 3I), demonstrando que o FSH provavelmente participa da retomada da meiose por outra via de sinalização que não envolve a PKC.

Nos oócitos maturados sem estímulo hormonal, a adição de BIM aumentou significativamente ($p < 0,01$) a porcentagem de oócitos bloqueados em VG, quando comparado aos oócitos maturados sem o inibidor de PKC (66,38% e 5,54%, respectivamente), indicando que a PKC também está envolvida na retomada espontânea (sem estímulo hormonal) da meiose (Figura 3I).

Figura 3 – Efeito da inibição da PKC na retomada da meiose de oócitos bovinos. Os dados representam a porcentagem de oócitos no estágio de Vesícula Germinativa (VG) ou não (Pós-VG), após 24 horas de maturação com diferentes tratamentos hormonais na presença ou não do inibidor de PKC (BIM).

II

Legenda: Observa-se em (I) que a PKC está envolvida na retomada espontânea do ciclo celular ou na retomada do ciclo celular na maturação oocitária mediada por LH ou pelo LH associado ao FSH (FSH/LH). Fotos ilustrativas dos oócitos avaliados com Hoechst 33342 nos estádios de VG e metáfase II (MII) são observados em (II). Letras diferentes representam diferença significativa para $p < 0.01$. São Paulo, 2012

6.2 A PKC PARTICIPA NA EXPANSÃO DAS CÉLULAS DO *CUMULUS* MEDIADA POR ESTÍMULO HORMONAL DURANTE A MATURAÇÃO

A sinalização celular estimulada pelas gonadotrofinas promove tanto a retomada da meiose quanto a expansão das células do *cumulus*, durante a maturação oocitária. Desta maneira, no presente trabalho foi avaliado se a PKC está também envolvida no processo de expansão das células do *cumulus* durante a maturação de oócitos bovinos.

Após a maturação, a expansão das células do *cumulus* foi avaliada por microscopia de epifluorescência. Os dados do maior diâmetro de cada complexo *cumulus* oócito em pixels obtidos pelo software Image Pro Plus 5.1 mostrou que o estímulo hormonal (FSH, LH e FSH/LH) promoveu, significativamente, maior expansão das células do *cumulus* em relação aos oócitos maturados sem hormônio ($p<0,01$).

Quando o envolvimento da PKC na expansão das células do *cumulus* foi avaliada, observou-se que o tratamento com o inibidor de PKC BIM na maturação estimulada por hormônios, reduziu significativamente ($p<0,01$) a capacidade do FSH, do LH e da combinação de ambos hormônios (FSH/LH) em promoverem a expansão das células do *cumulus*, durante a maturação de oócitos bovinos (Figura 4).

Entretanto, diferentemente do que foi observado na retomada da meiose, nenhum efeito da inibição da PKC foi observado na expansão das células do *cumulus* quando os oócitos foram maturados sem estimulação hormonal.

Figura 4 – Efeito da PKC na expansão das células do *cumulus* durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Média do maior diâmetro em pixels, de cada complexo *cumulus* oócito após maturação *in vitro*.

Legenda: As fotos ilustram a expansão das células do cumulus em cada tratamento do Experimento1. Letras diferentes representam diferença significativa para $p < 0.01$ São Paulo, 2012.

6.3 O EGF REESTABELECE A RETOMADA DA MEIOSE MEDIADA POR FSH/LH EM OÓCITOS BLOQUEADOS PELA INIBIÇÃO DA PKC

A maturação, induzida por FSH/LH também é mediada pelo EGF, que por sua vez participa da retomada da meiose e da expansão das células do *cumulus*. Em vista disto e pelo envolvimento que a PKC apresentou na maturação de oócitos bovinos (Experimento 1), no presente trabalho optou-se por estudar o EGF como um possível candidato da via de sinalização FSH/LH-PKC na maturação de oócitos bovinos.

Como observado anteriormente (item 6.1), os oócitos maturados sem estimulação hormonal (FSH/LH) retomaram a meiose de forma similar aos oócitos maturados na presença de LH/FSH (96 e 82,4%, respectivamente; Figura 4I). A inibição da PKC na maturação oocitária mediada por FSH/LH bloqueou de forma significativa a retomada da meiose em oócitos bovinos ($p < 0,01$), no qual apenas 48,3% dos oócitos retomaram a meiose na presença do inibidor de PKC BIM. Embora a inibição da PKC tenha bloqueado a retomada da meiose induzida por FSH/LH, este efeito inibitório foi revertido pela adição de EGF, que reestabeleceu a capacidade do FSH/LH de iniciarem a retomada da meiose (100%) em oócitos bovinos. Adicionalmente, também foi observado que a inibição da PKC não teve nenhum efeito na retomada da meiose mediada pelo EGF (Figura 4II). Baseado na capacidade do EGF em reverter o bloqueio meiótico promovido pela inibição da PKC na maturação mediada pelo FSH/LH, os resultados do presente trabalho sugerem a via de sinalização FSH/LH-PKC-EGF na retomada da meiose de oócitos bovinos.

Figura 5 – Efeito do EGF na retomada da meiose de oócitos bovinos.

Legenda: Em (I), observa-se que o EGF reverte o bloqueio meiótico dos oócitos promovido pela inibição da PKC durante a maturação estimulada pelas gonadotrofinas. Em II, a inibição da PKC não apresenta efeito na indução da retomada da meiose promovida pelo EGF, sem a interação das gonadotrofinas. em Em (III). Fotos ilustrativas dos oócitos marcados com Hoechst 33342 nos estádios de VG e metáfase II (MII) podem ser observadas Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0.01$). Os números nos gráficos representam a porcentagem de oócitos no estágio de Vesícula Germinativa (VG) ou não (Pós-VG). São Paulo, 2012

6.4 O EFEITO INIBITÓRIO DO BIM SOBRE A EXPANSÃO DAS CÉLULAS DO *CUMULUS* É REVERTIDO PELA ADIÇÃO DE EGF

Os resultados do presente estudo sugeriram o envolvimento da via de sinalização FSH/LH-PKC-EGF na retomada da meiose. Deste modo, foi avaliado se esta via também estaria envolvida na expansão células do *cumulus* durante a maturação de oócitos bovinos. Para isso, foi avaliado se os efeitos da inibição da PKC sobre a expansão das células do *cumulus* pode ser revertido pelo EGF

De forma semelhante ao observado no item 6.1, a maturação mediada por FSH/LH foi eficiente em promover de forma significativa ($p<0,01$) a expansão das células do *cumulus* em comparação aos oócitos maturados sem estímulo hormonal (Figura 5A). Estes resultados demonstram que embora a retomada da meiose possa ocorrer espontaneamente de forma independente de hormônio, a maturação oocitária estimulada pelo FSH/LH é essencial para que a expansão das células do *cumulus* ocorra. Durante a maturação oocitária na presença de FSH/LH, o tratamento com BIM inibiu significativamente ($p<0,01$) a expansão das células do *cumulus*, que foi similar à observada nos oócitos maturados sem estímulo hormonal (Figura 5A), confirmando a importância da ativação da PKC na expansão das células do *cumulus* mediada por FSH/LH. Semelhantemente ao que foi observado na retomada da meiose (item 6.3), a adição de EGF reverteu o efeito inibitório do BIM, com relação à expansão das células do *cumulus* mediada por FSH/LH. Mesmo na presença do inibidor de PKC, a adição de EGF promoveu expansão similar àquela observada nos oócitos maturados sem inibição da PKC (Figura 5A). Nos oócitos maturados apenas com EGF, não foi observado nenhum efeito da inibição da PKC na expansão das células do *cumulus* (Figura 5B). Deste modo, estes resultados evidenciam que a expansão das células do *cumulus* durante a maturação de oócitos bovinos é mediada pela via de sinalização FSH/LH-PKC-EGF.

Figura 6 – Avaliação do papel do EGF na expansão das células do *cumulus*

Legenda: Observa-se em (A) que inibição da expansão das células do *cumulus* promovida pelo inibidor de PKC (BIM) e revertida pelo EGF. A expansão das células do *cumulus* promovida pelo EGF não é afetada pela inibição da PKC como ilustrado em (B). Pode-se observar em (C) fotos ilustrativas da expansão das células do cumulus nos diferentes tratamentos (da esquerda para a direita: 1, oócito sem indução hormonal; 2 oócito maturado com FSH/LH; 3 oócito após 24 horas de maturação com FSH/LH + BIM e 4 oócito maturado na presença de FSH/LH + BIM + EGF. letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0.01$). Os números presente nos gráficos representam a média da distância em pixels do maior diâmetro de cada complexo *cumulus* oócito

6.6 A PKC NÃO ESTÁ ENVOLVIDA NA PRODUÇÃO DE PROGESTERONA PELO COMPLEXO *CUMULUS*-OÓCITO

A estimulação do complexo *cumulus* oócito (CCO) por gonadotrofinas aumenta a produção de progesterona, que por sua vez participa na expansão das células do *cumulus* e na retomada da meiose. Deste modo, no presente trabalho foi avaliado o envolvimento da PKC na produção de progesterona pelos CCOs, na maturação mediada por FSH/LH.

Ao término da maturação, o meio de cultivo foi coletado e a concentração de progesterona mensurada por quimiluminescência. A concentração de progesterona na

maturação de oócitos mediada por FSH, LH e pela combinação de ambos os hormônios (FSH/LH) não diferiu significativamente da concentração observada nos oócitos maturados sem estímulo hormonal. Estes resultados sugerem que em oócitos bovinos, a produção de progesterona pelo CCO foi independente de estímulo gonadotrópico.

Ao se avaliar o envolvimento da PKC na produção da progesterona, foi observado que a inibição da ativação de PKC não afetou a concentração de progesterona no meio de cultivo ao término da maturação mediada ou não por FSH, LH e FSH (Figura 6A), demonstrando que a PKC não está envolvida na produção de progesterona na maturação oocitária mediada ou não por gonadotrofinas. Também não foi observada diferença significativa na produção de progesterona pelos CCOs maturados na presença de EGF, FSH ou na associação de ambos (EGF/FSH) como observado na figura 6A. Além disso, nenhum efeito da inibição da PKC foi observado na concentração de progesterona na maturação de oócitos bovinos na presença de EGF (Figura 6B).

Figura 7 – Papel da PKC na produção de progesterona pelo complexo *cumulus* oócito durante a maturação in vitro de oócitos bovino.

Legenda: Em (I), observa-se o efeito da inibição da PKC na produção de progesterona durante a maturação sem hormônio, com FSH, com LH ou com a associação de FSH + LH. Em (II) a concentração de progesterona produzida durante a maturação com FSH, com EGF ou com a associação de ambos (FSH + EGF.). A inibição da PKC não afeta a produção de progesterona durante a maturação promovida pelo EGF. Os dados representam a concentração de progesterona em ng/ml. São Paulo, 2012

6.7 ATIVAÇÃO DA PKC E DA MAPK

Para se avaliar a ativação da PKC e da MAPK, foi utilizada a técnica de Western blot, avaliando a relação entre massa de proteína fosforilada e massa de proteína total. No entanto a técnica não permitiu a avaliação adequada da ativação, uma vez que as proteínas fosforiladas não foram detectadas nos tratamentos (Figuras 7 e 8).

Figura 8 - Membranas incubadas com anticorpo anti PKC.

Legenda: Membranas reveladas por quimioluminescência na técnica de Western Blot utilizando como amostra células do *cumulus* de 20 oócitos maturados *in vitro* durante 24 horas (A): membrana incubada com anticorpo anti PKC fosforilada, obtida durante a padronização da técnica. O círculo indica as bandas referentes à presença da proteína fosforilada. (B): membrana incubada com anticorpo anti PKC Total. A seta indica a banda referente ao padrão de peso molecular Spectra Multicolor (Fermentas), correspondendo ao tamanho de 72 kDa. O tamanho das bandas esperadas para a PKC total eram de 76kDa. As bandas são correspondentes à amostras de uma das replicatas do experimento 2 (C): anticorpo anti PKC fosforilada na mesma membrana de (B) O retângulo indica marcação inespecífica São Paulo, 2012.

Figura 9 - Membranas incubadas com anticorpo anti MAPK.

Legenda: Membranas reveladas por quimioluminescência na técnica de Western Blot utilizando como amostra 20 oócitos maturados *in vitro* durante 24 horas (A): membrana incubada com anticorpo anti MAPK fosforilada, resultado obtido durante padronização da técnica. As bandas se referem à presença da proteína fosforilada, e correspondem a amostras testes com 20 oócitos maturados *in vitro* durante 24 horas. (B): anticorpo anti MAPK Total. As bandas são correspondentes à amostras de uma das replicatas do experimento 2. (C): anticorpo anti MAPK fosforilada na mesma membrana de (B) São Paulo, 2012.

Discussão

7 DISCUSSÃO

A qualidade do oócito é um fator limitante na fertilidade das fêmeas e reflete intrínseco potencial no desenvolvimento embrionário. As alterações moleculares e bioquímicas no processo de maturação dos oócitos são necessárias para permitir a fecundação destes (GILCHRIST *et al.*, 2008). Sob influência das gonadotrofinas, uma cascata de eventos é desencadeada alterando a expressão gênica e a estrutura dos folículos com interação entre o oócito e as células da granulosa e da teca (RUSSELL; ROBKER, 2007).

Os resultados do presente trabalho demonstram que a PKC está envolvida na maturação de oócitos bovinos e que esta ação é mediada pelo EGF.

Após as 24 horas de maturação, os oócitos que tiveram a ativação da PKC inibida apresentaram maior taxa de bloqueio meiótico em relação aos maturados na ausência de inibição, nos tratamentos estimulados pelo LH e LH/FSH conjuntamente. No entanto, o tratamento com FSH não apresentou diferença na presença ou na ausência de inibidor. Curiosamente, os oócitos submetidos à maturação, sem o acréscimo de gonadotrofinas apresentaram taxa de quebra de vesícula germinativa significativamente maior em relação ao referido tratamento acrescido de inibidor de PKC. Estes resultados confirmam a participação da PKC na retomada da meiose de forma espontânea ou estimulada por gonadotrofinas em oócitos bovinos.

A diminuição das taxas de quebra de vesícula germinativa com o uso do inibidor de PKC nos tratamentos com gonadotrofinas indica o envolvimento desta proteína em uma das vias de sinalização estimuladas pelo LH, mas não pelo FSH. A existência de mais de uma via ativada pelo LH é plausível, uma vez que a inibição de um componente de uma destas vias diminui as taxas de quebra de vesícula germinativa, mas não impede completamente a retomada da meiose.

Possivelmente o estímulo do LH nesta via ativa a PKC, a qual induz a expressão de EGF que, por sua vez, ativa a MAPK. Com a inibição da PKC toda cascata é inativada, excluindo a via do processo de maturação. A progressão do ciclo celular, no entanto, continua ocorrendo num percentual de células, deixando clara a participação de outras moléculas no evento.

A sugestão desta via é sustentada pelos resultados da avaliação da quebra da vesícula germinativa no experimento 2, no qual os tratamentos que demonstraram a ativação da PKC inibida apresentaram aumento da taxa de quebra de vesícula germinativa quando o EGF foi

adicionado. A presença ou a ausência do inibidor nos tratamentos os quais a maturação foi estimulada apenas com EGF, não apresentou efeito sobre as taxas de quebra de vesícula germinativa, evidenciando que o EGF participa posteriormente à PKC nesta cascata, e é suficiente para ativar a retomada da meiose, mesmo na ausência de gonadotrofinas. A conclusão de que esta via de sinalização ocorre de fato seria verdadeira caso os resultados da ativação da MAPK confirmassem a inativação desta proteína nos tratamentos em que o inibidor de PKC foi utilizado, ou nos tratamentos sem a presença de gonadotrofinas. E seria evidenciada com a comprovação da ativação da MAPK nos tratamentos suplementados com gonadotrofinas, ou com EGF, mesmo com a inibição da PKC.

O fato dos oócitos estimulados pelo FSH não apresentaram diferenças entre os grupos com ou sem inibidor de PKC sugere que a participação do FSH na retomada da meiose se dá por outras vias de sinalização. O aumento de cAMP nas células do *cumulus* pelo FSH pode promover a ativação da MAPK via PKA ativada, promovendo a fosforilação do MPF e conduzindo para a retomada da meiose. Resultado semelhante foi observado em oócitos de camundongos cultivados na presença de FSH e ativadores ou inibidores da PKC (DENYS *et al.*, 2007).

O presente trabalho também demonstrou que a maturação *in vitro* sem o tratamento prévio com gonadotrofinas foi suficiente para estimular a retomada da meiose, sugerindo a espontaneidade do evento. A inibição da PKC, neste contexto, bloqueou a progressão do ciclo meiótico. Possivelmente a retomada da meiose espontânea ocorra pela liberação do COC do folículo, retirando fatores inibitórios da meiose tais como hipoxantina, ciclohexamina, além da interação entre os oócitos e as células do folículo. Os resultados demonstram que a retomada da meiose espontânea é mediada pela PKC, no entanto quais as moléculas envolvidas na cascata não estão elucidadas, e não parece envolver o EGF. Os resultados confirmam a participação da PKC na retomada da meiose de forma espontânea ou estimulada por gonadotrofinas em oócitos bovinos.

Numerosos fatores estão envolvidos na regulação da retomada da meiose, sendo que esta pode ser ativada por mais de uma via. Em mamíferos, a retomada da meiose *in vivo* é desencadeada pelo pico de LH momentos antes da ovulação e parece ser a principal sinalização no folículo para que o evento ocorra (MEHLMANN, 2005). A ativação de duas vias de sinalização da retomada da meiose pelo LH foi proposta para camundongos, sendo uma delas dependente e a outra independente de MAPK (NORRIS *et al.*, 2010). A participação da PKC via LH na retomada da meiose é dependente de MAPK. A retomada da meiose pode ocorrer de forma espontânea, como consequência da liberação do complexo

cumulus oócito de seu ambiente folicular, provavelmente pela retirada de fatores que inibem a meiose, como a hipoxantina (FAN *et al.*, 2002). Em camundongos, a retomada da meiose estimulada por gonadotrofinas envolve a PKC.

A inibição da PKC impediu a retomada da meiose, enquanto que a ativação farmacológica da PKC induziu a quebra da vesícula germinativa em COCs, bem como a ativação da MAPK. No entanto, a ativação da PKC inibiu a retomada espontânea da meiose em oócitos desnudos, sugerindo ação da PKC na retomada da meiose via células do *cumulus* (FAN *et al.*, 2004). A inibição da PKC em COCs de suínos também inibiu a retomada da meiose estimulada por gonadotrofinas (SU *et al.*, 1999). Em bovinos, a ativação da PKC aumentou consideravelmente as taxas de retomada da meiose (MONDADORI *et al.*, 2008). A inibição da PKC bloqueou a retomada da meiose estimulada por gonadotrofinas, mas não foi capaz de bloquear a retomada da meiose estimulada por EGF em camundongos (CHEN. *et al.*, 2008). Em camundongos, o inibidor de PKC BIM I foi capaz de prevenir a retomada da meiose estimulada pelo FSH. O AG1478, um inibidor do receptor de EGF, bloqueou a retomada da meiose estimulada por ativador da PKC (DOWNS; CHEN, J., 2008).

Sabe-se que a maturação oocitária estimulada por gonadotrofinas em roedores é mediada pelo EGF, o qual desencadeia a retomada da meiose (PARK. *et al.*, 2004). Oócitos bovinos maturados *in vitro* na presença de EGF atingiram o estágio de MII em maior número do que os maturados sem o EGF (PARK. *et al.*, 1997). Norris et al (2010) observaram que a ativação de receptores de EGF diminuiu a permeabilidade das junções *gap* em consequência da oclusão destas e conduz o oócito à retomada da meiose por diminuir os níveis de cGMP, garantindo a queda nos níveis de cAMP, o que irá promover a retomada da meiose. No mesmo estudo, demonstraram que a inibição da MAPK não teve efeito sobre a diminuição de cGMP, demonstrando que a via pela qual o EGF ativa a MAPK não participa da diminuição do cGMP.

De forma similar, o presente estudo demonstrou que o EGF foi suficiente para reverter os efeitos da inibição da PKC sobre a quebra da vesícula germinativa. A indução pelas gonadotrofinas conduziu à retomada da meiose. A inibição da PKC na maturação mediada por FSH/LH bloqueou de forma significativa a retomada da meiose em oócitos bovinos. Este efeito inibitório foi eficientemente revertido pelo EGF. Além disto, a retomada da meiose mediada pelo EGF não sofreu efeito do inibidor de PKC, sugerindo a via de sinalização FHS/LH – PKC – EGF na retomada da meiose de oócitos bovinos.

Tendo em vista o envolvimento do FSH e do LH na expansão das células do *cumulus*, avaliou-se no presente trabalho se a PKC estaria envolvida na expansão das células do

cumulus. Houve considerável expansão destas células na presença de LH, FSH ou de ambos. No entanto, a presença do inibidor de PKC conjuntamente com as gonadotrofinas reduziu esta expansão significativamente. Podendo ter efeito sobre a expressão gênica destas. A ausência de gonadotrofinas não aumentou a expansão das células do *cumulus*.

Como os resultados do presente estudo sugeriram o envolvimento da via de sinalização FSH/LH-PKC-EGF na retomada da meiose, numa segunda etapa foi avaliado se esta via também estaria envolvida na expansão células do *cumulus* durante a maturação de oócitos bovinos. Para isso, foi avaliado se os efeitos da inibição da PKC sobre a expansão das células do *cumulus* poderia ser revertido pelo EGF.

Os resultados mostram que embora a retomada da meiose possa ocorrer espontaneamente de forma independente de hormônio, a maturação oocitária estimulada pelo FSH/LH é essencial para que a expansão das células do *cumulus* ocorra. As gonadotrofinas se mostraram eficientes em promover esta expansão, com aumento do diâmetro médio dos COCs. A expansão garante ao oócito uma maior competência no desenvolvimento. A matriz extracelular nos COCs com expansão adequada fornecerá aos oócitos substratos para seu desenvolvimento. Elementos parácrinos e autócrinos podem conferir ao oócito maior e melhor capacitação, que, em eventos subsequentes, a fecundação, por exemplo, pode ser requerida conduzindo, possivelmente, o oócito a uma melhor maturação citoplasmática. A alteração física e fisiológica das células do *cumulus* promovida pelas gonadotrofinas é mediada pela PKC.

Assim como na retomada da meiose, o EGF teve efeito compensatório sobre a inibição da PKC na expansão das células do *cumulus*. A ativação do EGF atua sobre a expansão das células do *cumulus* e reverte o efeito que o inibidor da PKC tem sobre as gonadotrofinas, não sendo afetado por este quando foi o agente estimulante da maturação. A cascata da maturação de oócitos bovinos pelo estímulo das gonadotrofinas ocorre nas células do *cumulus* e promove tanto a expansão destas como a quebra da vesícula germinativa.

A atuação das gonadotrofinas na maturação se dá de forma sinérgica atuando sobre mais de uma via de sinalização. O EGF é suficiente para promover as alterações nas avaliações da quebra da vesícula germinativa e expansão das células do *cumulus*. De forma orquestrada, as vias de sinalização mostram a necessidade da interação das gonadotrofinas e da interação celular entre as células somáticas e o oócito para este adquirir a competência necessária.

Em camundongos, a expansão das células do *cumulus* é dependente da sinalização do estímulo de gonadotrofinas ou do EGF (BUCCIONE *et al.*, 1990) e de fatores parácrinos

secretados pelo oócito que agem sobre as células do *cumulus* permitindo a resposta destas ao sinal das gonadotrofinas ou do EGF para a síntese da matriz extracelular (GILCHRIST *et al.*, 2008). Ainda nesta espécie, a ativação da PKC promove maior expansão das células do *cumulus* em relação ao grupo inibido, o que demonstra a participação da PKC na expansão das células do *cumulus*.

A via de sinalização das gonadotrofinas nas células do *cumulus* envolvendo a PKC acarreta em alterações físicas e fisiológicas, com diferente expressão gênica e síntese proteica. A onda de LH induz a expressão de genes, como o HAS-2, responsável pela síntese de ácido hialurônico, principal componente da matriz extracelular do COC (RICHARDS, 2005). Concomitante com a maturação citoplasmática e nuclear, as células do *cumulus* sofrem alterações físicas e fisiológicas denominadas em conjunto de expansão das células do *cumulus* (TAKAHASHI *et al.*, 2006).

A competência oocitária envolve a capacidade de esteroidogênese pelas células do *cumulus*. A concentração de progesterona na maturação de oócitos mediada por FSH, LH e pela combinação de ambos os hormônios (FSH/LH) não diferiu significativamente da concentração observada nos oócitos maturados sem estímulo hormonal. Estes resultados sugerem que em oócitos bovinos, a produção de progesterona pelo COC foi independente de estímulo gonadotrópico, diferente do esperado.

Ao se avaliar o envolvimento da PKC na produção da progesterona foi observado que a inibição da ativação de PKC não afetou a concentração desta no meio de cultivo ao término da maturação mediada ou não por FSH ou LH/ FSH (Figura 5A), demonstrando que a PKC não está envolvida com a produção de progesterona na maturação oocitária mediada ou não por gonadotrofinas. Também não foi observada diferença significativa na produção de progesterona pelos COCs maturados na presença de EGF, FSH ou na associação de ambos (EGF/FSH) como observado na figura 5A. Além disso, nenhum efeito da inibição da PKC foi observado na concentração de progesterona na maturação de oócitos bovinos na presença de EGF (Figura 5B).

Os resultados sugerem que a produção de progesterona pelas células do *cumulus* não é mediada pela via LH/FSH – PKC - EGF

A expressão da StAR e a esteroidogênese foram avaliadas em camundongos. Foi observado que a PKC intermedeia a produção de progesterona pela ativação da MAPK (MANNA *et al.*, 2009). Em outro estudo, demonstraram que o EGF promove a esteroidogênese a partir da sinalização desencadeada no receptor de EGF (JAMNONGJIT *et al.*, 2005). Estes resultados contradizem os do presente estudo, nos quais as gonadotrofinas, a

PKC e o EGF não estão envolvidos na esteroidogênese, no entanto, a ação da PKC na maturação de oócitos é bastante controversa nas diferentes espécies.

Com o objetivo de se confirmar a inativação da PKC nos grupos nos quais o inibidor foi adicionado e para avaliar a ativação da MAPK via PKC e EGF, foram realizadas análises da ativação da PKC e da MAPK pela técnica de western blot. A avaliação da ativação das proteínas deveria ter sido realizada pela quantificação da expressão relativa das massas de proteínas fosforiladas em relação às massas de proteínas totais.

Os resultados das análises, no entanto, não geraram dados de forma que permitissem adequada avaliação da ativação destas proteínas. Durante a padronização da técnica, a detecção das proteínas alvo foi observada nas bandas geradas pela captação da quimioluminescência. No entanto, durante a fase experimental, a quantificação da massa das proteínas fosforiladas nas amostras não foram reveladas na membrana.

A quebra da vesícula germinativa ocorre por volta de 6 a 8 horas, e a ativação da MAPK e da PKC foi avaliada após 24 horas de maturação. Desta forma, talvez a melhor avaliação da MAPK e da PKC seria 6 a 8 horas após o início da maturação. No entanto, segundo trabalhos anteriores, é possível detectar a ativação destas proteínas ao longo de todo processo de maturação (KUBELKA *et al.*, 2000; MONDADORI *et al.*, 2008), desta forma, as proteínas fosforiladas das amostras do presente estudo deveriam ter sido detectadas, independente do tempo de coleta da amostra.

Os anticorpos foram escolhidos a partir de citações na literatura. São anticorpos de empresas com grande confiabilidade no mercado, havendo um grande número de trabalhos os quais utilizaram estes anticorpos, o que não deve ter sido o ponto crítico para a detecção das proteínas, uma vez que durante a padronização isso ocorreu.

Possivelmente, a menor estabilidade da proteína fosforilada, pode ter sido o ponto que culminou com a não detecção desta. Mesmo após a lise celular e a linearização das proteínas em tampão *Laemmli*, imediatamente após a retirada dos oócitos do cultivo, a degradação das proteínas fosforiladas das amostras pode ter ocorrido. As amostras foram coletadas em período anterior às análises, fato este ocorrido pela demora excessiva na entrega dos anticorpos. Tal fato é rotineiro no país e devemos nos programar para tal. No entanto, as inúmeras burocracias que cercam os processos de compra e importação, muitas vezes emperram os projetos de pesquisa ou parte deles.

Os resultados mostram a evidente participação da PKC e respectiva ação mediada pelo EGF em importantes eventos da maturação do oócito em bovinos, como a maturação e a expansão das células do cumulus. No entanto, demonstram também que esta via não participa

da esteroidogênese. Há fortes evidências de que a referida via envolve a participação da MAPK, no entanto problemas no delineamento ou na técnica adotada, neste presente estudo, impediram a elucidação desta questão. A complexidade das vias envolvidas na maturação oocitária exige mais estudos na área para a melhor compreensão deste breve, mas importante evento.

Conclusão

8 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

1 – A PKC está envolvida na via de sinalização para a maturação de oócitos bovinos, participando de eventos como a quebra da vesícula germinativa e a expansão das células do *cumulus*.

2 – O EGF é capaz de compensar o efeito da inibição da PKC tanto sobre a retomada da meiose quanto à expansão das células do *cumulus*.

3 – Baseando se nos dados obtidos e na literatura, é sugestivo que a via de sinalização na qual a PKC age sobre a maturação de oócitos bovinos envolve o EGF, sendo necessários estudos que demonstrem esse envolvimento (Figura 10).

Figura 10 – Modelo Gráfico da via de sinalização da PKC na Maturação do oócito

Legenda: Via de sinalização das gonadotrofinas na retomada da meiose. A via LH/FSH - PKC é ativada. O EGF compensa os efeitos da inibição da PKC. Ocorre expansão das células do *cumulus* e quebra da vesícula germinativa (VG). A via LH/FSH-PKC-EGF é sugerida, envolvendo possivelmente a MAPK. São Paulo, 2012.

Referências

REFERÊNCIAS

- ADRIAENS, I.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence. **Human Reproduction**, v. 19, n. 2, p. 398-408, 1 fev 2004.
- AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in domestic animals**, v. 45, n. 1, p. 171-9, fev 2010a.
- AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. **Reproduction in domestic animals**, v. 45, n. 1, p. 180-7, fev 2010b.
- ALBERTINI, D. F.; COMBELLES, C. M. H.; BENECCCHI, E.; CARABATSOS, M. J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Development**, v. 121, n. 1, p. 647-653, 2001.
- ANAS, M.-KHEIR I.; SHIMADA, M.; ZENG, W. Cultured In Vitro with EGF and Wortmannin. **Journal of Mammalian Ova Research**, v. 17, n. 1, p. 103-108, 2000.
- ARMSTRONG, D. T.; XIA, P.; GANNES, G. DE; TEKPETEY, F. R.; KHAMSI, F. Differential effects of insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone on proliferation and differentiation of bovine cumulus cells and granulosa cells. **Biology of reproduction**, v. 54, n. 2, p. 331-338, fev 1996.
- ASSIDI, M.; DIELEMAN, S. J.; SIRARD, M.-A. Cumulus cell gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence. **Reproduction**, v. 140, n. 6, p. 835-52, dez 2010.
- BADINGA, L.; SAVIO, J. D. Endocrine and Ovarian Responses Associated in Cattle¹ with the Dominant Follicle. **Biology of Reproduction**, v. 47, n. 4, p. 871-883, 1992.
- BALTUS, A. E.; MENKE, D. B.; HU, Y.-C. *et al.* In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. **Nature genetics**, v. 38, n. 12, p. 1430-1434, dez 2006.
- BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, n. 1, p. 165-171, 1996.
- BUCCIONE, R.; VANDERHYDEN, B. C.; CARON, P. J.; EPPIG, J. J. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. **Developmental biology**, v. 138, n. 1, p. 16-25, mar 1990.
- BYSKOV, A. G.; ANDERSEN, C. Y.; LEONARDBSEN, L. Role of meiosis activating sterols, MAS, in induced oocyte maturation. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 187, n. 1-2, p. 189-96, 22 fev 2002.

-
- CARNEIRO, G. F.; LIU, I. K. M.; HYDE, D.; ANDERSEN, G.B. LORENZO' P.L.; BALL, B.A. Quantification and distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation. **Molecular reproduction and development**, v. 63, n. 4, p. 451-8, dez 2002.
- CAVENDER, J. L.; MURDOCH, W. J. Studies of the Microcirculatory of Periovary. **Biology of reproduction**, v. 39, n. 1, p. 989-997, 1988.
- CHEN, X.; ZHOU, B.; YAN, J.; XU, B.; TAI, P.; LI, J.; PENG, S.; ZHANG, M.; XIA, G.; Epidermal growth factor receptor activation by protein kinase C is necessary for FSH-induced meiotic resumption in porcine cumulus-oocyte complexes. **The Journal of endocrinology**, v. 197, n. 2, p. 409-19, maio 2008.
- CONTI, M.; ANDERSEN, C. B.; RICHARD, F; MEHATS, C; CHUN, S.Y.; HORNER, K.; JIN, C.; TSAFRIRI A. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 187, n. 1-2, p. 153-159, 22 fev 2002.
- CORTVRINDT, R.; SMITZ, J; STEIRTEGHEM, A C. VAN. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 12, n. 4, p. 759-68, abr 1997.
- DELL'AQUILA, M. E.; CAILLAUD, M.; MARITATO, F. *et al.* Cumulus expansion, nuclear maturation and connexin 43, cyclooxygenase-2 and FSH receptor mRNA expression in equine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro in the presence of FSH and precursors for hyaluronic acid synthesis. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 2, n. 1, p. 44, 22 jun 2004.
- DENYS, A.; AVAZERI, N.; LEFE, B. The PKC Pathway and in Particular its b1 Isoform is Clearly Involved in Meiotic Arrest Maintenance but Poorly in FSH-induced Meiosis Resumption of the Mouse Cumulus Cell Enclosed Oocyte. **Journal of Experimental Zoology**, v. 1580, n. 5, p. 1575-1580, 2007.
- DOWNS, S M; COTTOM, J.; HUNZICKER-DUNN, M. Protein kinase C and meiotic regulation in isolated mouse oocytes. **Molecular reproduction and development**, v. 58, n. 1, p. 101-15, jan 2001.
- DOWNS, S. M.; CHEN, J. EGF-Like Peptides Mediate FSH-Induced Maturation of Cumulus Cell-Enclosed Mouse Oocytes. **Culture**, v. 114, n. 1, p. 105-114, 2008.
- EPPIG, J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 829-838, 1 dez 2001.
- FAN, H.-Y.; LI, M.-Y.; TONG, C. *et al.* Inhibitory effects of cAMP and protein kinase C on meiotic maturation and MAP kinase phosphorylation in porcine oocytes. **Molecular reproduction and development**, v. 63, n. 4, p. 480-487, dez 2002.
- FAN, H.-Y.; SUN, Q.-Y. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. **Biology of reproduction**, v. 70, n. 3, p. 535-47, mar 2004.

-
- FAN, H.-YU; HUO, L.-JUN; CHEN, D.-YUAN; SCHATTEN, H.; SUN, Q.-YUAN. Protein Kinase C and Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade in Mouse Cumulus Cells : Cross Talk and Effect on Meiotic Resumption of Oocyte 1. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 4, p. 1178-1187, 2004.
- FINDLAY, J.; DRUMMOND, A. Regulation of the FSH Receptor in the Ovary. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 10, n. 5, p. 183-188, jul 1999.
- GILCHRIST, R B; NAYUDU, P. L.; HODGES, J. K. Maturation, fertilization, and development of marmoset monkey oocytes in vitro. **Biology of reproduction**, v. 56, n. 1, p. 238-46, jan 1997.
- GILCHRIST, R B; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal reproduction science**, v. 82-83, p. 431-46, jul 2004.
- GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human reproduction update**, v. 14, n. 2, p. 159-177, 2008.
- GILL, A.; JAMNONGJIT, M.; HAMMES, S. R. Androgens promote maturation and signaling in mouse oocytes independent of transcription: a release of inhibition model for mammalian oocyte meiosis. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 18, n. 1, p. 97-104, jan 2004.
- GOSDEN, R.G.; HUNTER, R.H.F.; TELFER, E.; TORRANCE, C.; BROWN, N. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. **J Reprod Fertil** v. 82, p. 813–825, 1988
- JOHNSON, G. L.; DHANASEKARAN, N. The G-Protein Family and Their Interaction with Receptors. **Endocrine Reviews**, v. 10, n. 3, p. 317-331, 1 ago 1989.
- JAMNONGJIT, M.; GILL, A.; HAMMES, S. R. Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 45, p. 16257-62, 8 nov 2005.
- KANATSU-SHINOHARA, M.; SCHULTZ, R. M.; KOPF, G. S. Acquisition of meiotic competence in mouse oocytes: absolute amounts of p34(cdc2), cyclin B1, cdc25C, and weel in meiotically incompetent and competent oocytes. **Biology of reproduction**, v. 63, n. 6, p. 1610-6, dez 2000.
- KISHIMOTO, T. Cell-cycle control during meiotic maturation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 654-663, dez 2003.
- KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. Review Potential local regulatory functions of inhibins , activins and follistatin in the ovary. p. 503-512, 2001.

- KRUEGER, X.; HEUWIESER, W. Effect of flunixin meglumine and carprofen on pregnancy rates in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5140–5146, 2010. doi: 10.3168/jds.2010-3072
- KUBELKA, M.; MOTLÍK, J.; SCHULTZ, R. M.; PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, Without influencing chromosome condensation activity. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 2, p. 292-302, fev 2000.
- LIANG, C.G.; SU, Y.Q.; FAN, H.Y.; SCHATTEN, H.; SUN, Q.Y. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 21, n. 9, p. 2037-55, set 2007.
- LU, Z.; XIA, G; ZHANG, J. Protein kinase C, rather than protein kinase A is involved in follicle-stimulating hormone-mediated meiotic resumption of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in hypoxanthine-supplemented medium. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 182, n. 2, p. 225-32, set 2001.
- LUCIDI, P.; BERNABÒ, N.; TURRIANI, M.; BARBONI, B.; MATTIOLI, M. Cumulus cells steroidogenesis is influenced by the degree of oocyte maturation. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 1, n. 1, p. 45, 28 maio 2003.
- MANNA, P. R.; HUHTANIEMI, I. T.; STOCCO, D. M. Mechanisms of protein kinase C signaling in the modulation of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated steroidogenesis in mouse gonadal cells. **Endocrinology**, v. 150, n. 7, p. 3308-3317, jul 2009.
- MARSTON, A. L.; AMON, A. Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 5, n. 12, p. 983-97, dez 2004.
- MAYES, M. A; SIRARD, M. A. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 911-22, 1 mar 2001.
- MEHLMANN, L. M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, v. 130, n. 6, p. 791-799, dez 2005.
- MOHAN, M.; THIRUMALAPURA, N. R.; MALAYER, J. Bovine cumulus-granulosa cells contain biologically active retinoid receptors that can respond to retinoic acid. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 1, p. 104, 13 nov 2003.
- MONDADORI, R. G.; NEVES, J. P.; GONÇALVES, P. B. D. Protein kinase C (PKC) role in bovine oocyte maturation and early embryo development. **Animal reproduction science**, v. 107, n. 1-2, p. 20-9, ago 2008.
- NORRIS, R. P.; RATZAN, W. J.; FREUDZON, M. *et al.* Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development (Cambridge, England)**, v. 136, n. 11, p. 1869-78, jun 2009.
- NORRIS, R. P.; FREUDZON, M.; NIKOLAEV, V. O.; JAFFE, L. A. Epidermal growth factor receptor kinase activity is required for gap junction closure and for part of the decrease

- in ovarian follicle cGMP in response to LH. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 140, n. 5, p. 655-62, nov 2010.
- PARK, K. W.; IGA, K.; NIWA, K. Exposure of bovine oocytes to EGF during maturation allows them to develop to blastocysts in a chemically defined medium. **Theriogenology**, v. 48, n. 2, p. 1127-1135, 1997.
- PARK, J.-Y.; SU, Y.-Q.; ARIGA, M. *et al.* EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v. 303, n. 1, p. 682-684, 30 jan 2004.
- REIMERS, T. J.; SALERNO, V. J.; LAMB, S. V. Validation and Application of Solid-phase Chemiluminescent Immunoassays for Diagnosis of Endocrine Diseases in Animals **Comparative Haematology International** v.6, p. 170-175, 1996.
- RICHARDS, J S. Perspective: the ovarian follicle--a perspective in 2001. **Endocrinology**, v. 142, n. 6, p. 2184-93, jun 2001.
- RICHARDS, JOANNE S. Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 234, n. 1-2, p. 75-79, 29 abr 2005.
- RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid. **Biology of reproduction**, v. 82, n. 6, p. 1021-1029, 2010.
- RUSSELL, D. L.; ROBKER, R. L. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. **Human reproduction update**, v. 13, n. 3, p. 289-312, 2007.
- SÁNCHEZ, F.; ADRIAENSSENS, T.; ROMERO, S.; SMITZ, JOHAN. Different Follicle-Stimulating Hormone Exposure Regimens During Antral Follicle Growth Alter Gene Expression in the Cumulus-Oocyte Complex in Mice 1. **Biology of reproduction**, v. 83, n. 6, p. 514-524, 2010.
- SHAUGHNESSY, P. J. O.; DUDLEYB, K. Expression of follicle stimulating hormone-receptor gonadal development mRNA during. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 125, n. 1, p. 169-175, 1996.
- SIRARD, M.-A.. Resumption of meiosis : mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 418, p. 1241-1254, 2001.
- SIRARD, M.-A; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**, v. 68 Suppl 1, p. S71-6, 1 set 2007.
- SOMMERVILLE, J.; LADOMERY, M. Chromosoma Focus. **Chromosoma**, v. 104, n. 7, p. 469-478, 1 abr 1996.
- SU, Y. Q.; XIA, G. L.; BYSKOV, A G.; FU, G. D.; YANG, C. R. Protein kinase C and intracellular calcium are involved in follicle-stimulating hormone-mediated meiotic resumption of cumulus cell-enclosed porcine oocytes in hypoxanthine-supplemented medium. **Molecular reproduction and development**, v. 53, n. 1, p. 51-58, maio 1999.
- SU, Y.Q.; SUGIURA, K.; WIGGLESWORTH, K.; O'BRIEN, M.J.; AFFOURTIT, J.P; PANGASSA; MATZUK, M.M.; EPPIG, J.J. Oocyte regulation of metabolic cooperativity

between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. **Development (Cambridge, England)**, v. 135, n. 1, p. 111-21, jan 2008.

SUN, Q.Y.; MIAO, Y.; SCHATTEN, H. Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. **Cell Cycle**, v. 8, n. 17, p. 2741-2747, 2009.

TAKAHASHI, T.; MORROW, J. D.; WANG, H.; DEY, S. K. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E(2) directs oocyte maturation by differentially influencing multiple signaling pathways. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 48, p. 37117-37129, 1 dez 2006.

VASKIVUO, T.; ANTONEN, M.; HERVA, R. Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: apoptosis, apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA-4. **Journal of Clinical**, v. 86, n. 7, p. 3421-3429, 2001.

VIRANT-KLUN, I.; STIMPFEL, M.; SKUTELLA, T. Ovarian pluripotent / multipotent stem cells and in vitro oogenesis in mammals Histology and. **Histology and Histopathology**, v. 26, n. 4, p. 1071-1082, 2011.

WU, J.; TIAN, Q. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle in vitro. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 15, n. 3, p. 233-40, ago 2007.

ZHANG, M.; OUYANG, H.; XIA, G. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. **Molecular human reproduction**, v. 15, n. 7, p. 399-409, jul 2009.

ZHOU, H.; OHNO, N.; TERADA, N. *et al.* Involvement of follicular basement membrane and vascular endothelium in blood-follicle barrier formation of mice revealed by “in vivo cryotechnique.” **Reproduction**, v. 134, n. 1, p. 307-317, 2006.

Anexos

ANEXOS

Anexo A – Solução Fisiológica

Reagente	Quantidade	Marca/código
NaCl	0,9%	
Penicilina G	100U/ml	
Estreptomicina	100µg/ml	

Armazenar a 4°C, Validade: 1 mês

Solução Pen/Strep

Reagente	Quantidade	Marca/código
Estreptomicina	3 g	Sigma/S-6501
Penicilina G	1,8105	Sigma/P-3032
NaCl 0,9%	30 ml	Sigma/S-5886

Armazenar a -20°C; Validade: 6 meses

Anexo B - Meio de coleta (uso)

Reagente	Quantidade	Marca/código
Meio de fatiamento estoque	50 ml	-
Soro fetal bovino com heparina	500 µl	-
Solução de penicilina/streptomicina	50 µl	-

Uso diário; Filtrar 0,22 µM

Soro fetal bovino com heparina

Reagente	Quantidade	Marca/código
Heparina	0,571 ml	Sigma/H-3149
Água MilliQ	1 ml	-

Filtrar 0,22 µm e acrescentar

Soro fetal bovino	50 ml	Nutricell
-------------------	-------	-----------

Armazenar -20°C

Anexo C -Meio Pré-MIV

Reagente	Quantidade	Marca/código
TCM 199 HEPES	4,5 ml	Gibco/12350-039
Soro fetal bovino	0,5 ml	Gibco/16140-014
Solução de piruvato	10 µl	-
Solução de gentamicina	25 µl	-

Uso diário; Filtrar 0,22 µM

Anexo D - Meio MIV

Reagente	Quantidade	Marca/código
TCM 199 bicarbonato	4,5 ml	Gibco/11150-026
Soro fetal bovino	0,5 ml	Gibco/16140-014
Solução de piruvato	10 µL	-
Solução de gentamicina	25 µL	-

Filtrar 0,22 µm; Uso diário

Solução de estradiol	5 µL	-
----------------------	------	---

Solução de gentamicina 10 mg/ml

Reagente	Quantidade	Marca/código
Gentamicina	0,1 g	Sigma/G-1264
NaCl 0,9%	10 ml	Sigma/S-5886

Armazenar a -20°C; Validade: 6 meses

Solução de piruvato 100 Mm

Reagente	Quantidade	Marca/código
Piruvato	0,1320 g	Sigma/P-4562
NaCl 0,9%	12 ml	Sigma/S-5886

Armazenar a -20°C; Validade: 6 meses

Solução de estradiol 1 ug/ml

Reagente	Quantidade	Marca/código
Estradiol	0,02041 g	Sigma/E-4389
Água MilliQ	1 ml	-

Armazenar a -20°C; Validade: 6 meses

Solução de FSH (estoque)

Reagente	Quantidade	Marca/código
Folltropin V	400 mg	Bioniche/PHD075
NaCl 0,9%	2 ml	Sigma/S-5886

Armazenar a -20°C; Validade: 6 meses

Solução de FSH (uso) 0,5 mg/ml

Reagente	Quantidade	Marca/código
Solução estoque	50 µL	-
TCM 199 bicarbonato	20 ml	Gibco/11150-026

Armazenar a -20°C; Validade: 6 meses

Solução de LH 700 UI/ml

Reagente	Quantidade	Marca/código
Chorulon	5000 UI	Intervet/057176
TCM 199 bicarbonato	7,14 ml	Gibco/11150-026

Armazenar a -20°C; Validade: 6 meses

Solução de EGF µg/ml

Reagente	Quantidade	Marca/código
EGF	0.1mg	Sigma E-4127
TCM 199 bicarbonato	10 ml	Gibco/11150-026

Armazenar a -20°C; Validade: 6 meses

Anexo E - PBS 0,2M em 0,9% NaCl

Reagente	Quantidade	Marca/código
K ₂ HPO ₄	34,83 g	Sigma/P-5655
NaCl	9 g	Sigma/S-5886
Água MilliQ	1 L	-

Armazenar 4°C

Anexo F - PBS-PVP

Reagente	Quantidade	Marca/código
PBS (10 mM)	100 ml	-

PVP	0,1 g	Sigma/P0930
Armazenar 4°C		

Anexo G - Hoechst 33342 (estoque- 5mg/ml)

Reagente	Quantidade	Marca/código
Hoechst 33342	5 mg	Sigma/B-2261
PBS (10 mM)	1 ml	-

Armazenar -20°C

Anexo H - Hoechst 33342 - Uso

Reagente	Quantidade	Marca/código
Hoechst 33342 estoque	1 µL	-
PBS-PVP	1 ml	-

Uso diário

Anexo I Tampão Laemmli

Reagente	Quantidade	Marca/código
Tris-HCl 1,5M pH 6.8	4ml	-
Glicerol	10ml	-
B Mercaptoetanol	5ml	-
SDS	2g	-
Azul de bromofenol 1%	1ml	-

Anexo J**Gel de Poliacrilamida para Separação**

Componentes	Quantidades
Água Destilada e Deionizada	(7,5 - X/3)mL
Tampão Tris-HCl 1,5M pH8,8	2,5mL
SDS	100µL
Bis/Acrilamida	X/3
Persulfato de Amônio 10%	50µL
TEMED	5µL

Gel de Empilhamento

Componentes	Quantidades
Água Destilada e Deionizada	6,1mL
Tampão Tris-HCl 0,5M pH6,8	2,5mL
SDS a 10%	100µL
Bis/Acrilamida	1,33mL
Persulfato de Amônio a 10%	50µL
TEMED	10µL

Solução Tampão de Corrida (concentração quatro vezes)

Reagente	Quantidade	Marca/código
Tris Base	6,0g	-
Glicina	28,8g	-
SDS	2,0g	-
H ₂ O dd	400ml	-
Ajustar o pH para 8,3 com o auxílio de uma solução de HCl (3M)		
Armazenar em geladeira 4°C		

Anexo K - Tampão de Transferência

Reagente	Quantidade	Marca/código
Tris-Base	3,03g	-
Glicina	14,4g	-
SDS	1,0g	-
H ₂ O dd	800ml	-
Conferir Ph entre 8,4 e 8,7		
Armazenar em geladeira 4°C – no momento do uso adicionar 20% de metanol(200ml)-		
Armazenar poro período máximo de sete dias		

Anexo L - Solução de Bloqueio

Reagente	Quantidade	Marca/código
Leite em pó desnatado	7,5g	-
Solução Tampão TBS	150ml	-
Preparar solução imediatamente antes de seu uso		

Anexo M - Tampão TBS

Reagente	Quantidade	Marca/código
Tris-Base	4,84g	-
Nacl	58,44g	-
H ₂ O dd	2000ml	-
Homogeneizar e ajustar pH para 7,5 com auxílio de uma solução de acido clorídrico		

Armazenar em geladeira 4°C e por período máximo de sete dias

Anexo N - Tampão T-TBS

Reagente	Quantidade	Marca/código
TBS	1.000ml	-
TWEEN 20	1ml	-
Armazenar em geladeira 4°C e por período máximo de sete dias		