



---

**Universidade de Brasília**  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

DANIELLE KAISER DE SOUZA

AVALIAÇÃO DA VIA FOSFATIDILINOSITOL 3-CINASE EM CÉLULAS  
DO *CUMULUS* PROVENIENTES DE OVÓCITOS MATURADOS *IN*  
*VITRO* EM MEIO DEFINIDO

Brasília  
2014

DANIELLE KAISER DE SOUZA

AVALIAÇÃO DA VIA FOSFATIDILINOSITOL 3-CINASE EM CÉLULAS  
DO *CUMULUS* PROVENIENTES DE OVÓCITOS MATURADOS *IN*  
*VITRO* EM MEIO DEFINIDO

Tese apresentada à Universidade de Brasília, como exigência parcial do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Ciências Aplicadas em Saúde

Professora Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Alzira Amélia Martins  
Rosa e Silva

Brasília  
2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação  
Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

De Souza, Danielle Kaiser.

Avaliação da via fosfatidilinositol 3-cinase em células do *cumulus* provenientes de ovócitos maturados *in vitro* em meio definido / Danielle Kaiser de Souza.

Orientador Alzira Amélia Martins Rosa e Silva - Brasília, 2014.

Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina.  
126 folhas.

Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, 2014.

Nome: Danielle Kaiser de Souza.

Título: Avaliação da via fosfatidilinositol 3-cinase em células do *cumulus* provenientes de ovócitos maturados *in vitro* em meio definido.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, para obtenção do título de Doutor.

Aprovado em: 01 de setembro de 2014.

### **Banca Examinadora**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alzira Amélia Martins Rosa e Silva.

Instituição: Universidade de Brasília.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Loise Pedrosa Salles

Instituição: Faculdade de Odontologia do Planalto Central

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adelina Martha dos Reis

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Luiz Augusto Casulari Roxo da Motta

Instituição: Universidade de Brasília

Prof. Dr. Leopoldo Luiz dos Santos Neto

Instituição: Universidade de Brasília

Dedico o meu trabalho

*À minha mãe, pela dedicação e carinho em todos  
os momentos, e a todas as pessoas que me  
auxiliaram nessa jornada...*

*A minha gratidão por todos os ensinamentos e  
aprendizados nesse longo período!*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria, primeiramente, de agradecer a Deus, que nos concede essa breve existência e nos permite polir a alma e amadurecer na convivência com nossos semelhantes.

À minha mãe, uma das figuras mais importantes para mim e sem a qual essa jornada não seria possível. Obrigada pela paciência e apoio que tens me dado sempre! Agradeço à minha família toda também pelo apoio que me foi dado desde que entrei na graduação.

A minha orientadora, prof<sup>a</sup> Alzira Amélia, que tem me permitido aprender muito sobre ciência e reprodução! Agradeço a chance de fazer parte da trajetória dessa linha de pesquisa e por todas as oportunidades que tive a partir disso! O meu MUITO obrigada!!

Agradeço ao prof<sup>o</sup> Fernando Araripe e à prof<sup>a</sup> Beatriz Dolabela pelo apoio, em vários âmbitos, do trabalho aqui apresentado. Um agradecimento especial à Loise Pedrosa e Ricardo Camargo pelo apoio e presença durante os experimentos e, em especial, à Loise, pois sem sua “santa mão” jamais teria terminado os experimentos de PCR!

À Dani Cris, Silene e Ana Paula pela amizade e companheirismo nas nossas longas conversas! Muito obrigada!

Ao Raul, Ingrid, Camila Nobre, Isabela, Valter, Gustavo, Laura e Flávia Tuany, agradeço pelo convívio e apoio desde minha entrada no laboratório, e, principalmente à Ingrid que me ensinou muito sobre maturação ovocitária! Aos meus alunos Kamilla Lorena, Igor, Daniely, Suellen e Jéssica, obrigada pelo convívio e pela ajuda nos experimentos.

Ao Frigorífico Friboi e os funcionários João, “Seu Nego”, Bicudo, Toninho e Maranhão por cederem os ovários dos animais abatidos para a realização dos trabalhos.

Agradeço também à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo financiamento da pesquisa.

Muito obrigada a todos que contribuíram para a concretização desse projeto!!

*“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte.”*

Albert Einstein

## RESUMO

**Introdução:** A maturação do complexo *cumulus*-ovócito (CCO) *in vitro* depende do meio de cultivo no qual se encontra e é uma biotécnica bastante difundida para a geração de embriões bovinos para a produção de gado. A biologia do desenvolvimento do ovócito tem como indicadores a maturação nuclear, esteroidogênese, apoptose e nutrição dos CCOs, tendo as células do *cumulus* papel central nesses aspectos. A via fosfatidilinositol 3-cinase (PI3-K) tem ações comprovadas nos parâmetros citados, tornando-a ponto relevante no estudo da biologia dos CCOs bovinos. O presente trabalho visa estudar esses parâmetros para esclarecer algumas funções biológicas do meio definido e patenteado MIV B e da adição de 10 ng/mL de FSH. Para inferir a importância da PI3-K foi utilizado o inibidor dessa via (LY294002) durante o cultivo de CCOs.

**Métodos:** Ovário bovinos foram coletados em abatedouros e os CCOs aspirados para cultivo por 22–24 horas. Os seguintes meios-teste foram utilizados, tendo o meio MIV B como base: 0FSH; 0FSH 10LY (+10 µM LY294002); 0FSH 100LY (+100 µM LY294002); 10FSH; 10FSH 10LY ou 10FSH 100LY. Posteriormente, a dose de 10 µM foi excluída, pois não apresentou nenhum efeito. A androstenediona foi suplementada para sustentar a esteroidogênese. Após o cultivo, os CCOs foram desnudos e as células do *cumulus* isoladas para as aferições subsequentes.

Foram avaliadas a retomada e progressão da maturação nuclear, a expulsão do corpúsculo polar e a produção de hormônios 17 beta-estradiol (E2) e progesterona (P4). As células do *cumulus* foram analisadas para determinar a expressão de genes, por PCR real time, referentes à esteroidogênese (*LHR*, *FSHR*, *CYP11A1*, *CYP19A1* e *HSD17B1*), apoptose (*Bax*), sobrevivência celular (*Bcl-2*) e nutrição do CCO (*GLUT1*, *GLUT4*, *PDH*, *G6PDH* e *SNAP25*).

**Resultados:** No meio 0FSH foi encontrada imaturidade nuclear e baixa taxa de expulsão do corpúsculo polar. Porém, manteve a produção de E2 e P4 e a expressão dos receptores de FSH e LH e das enzimas da esteroidogênese, mimetizando a condição de folículo ovariano em crescimento. O meio 0FSH ainda apresenta baixa expressão de *Bax*, *Bcl-2* e *GLUT1* e aumento da expressão de *G6PDH* e *SNAP25*.

A adição do inibidor (meio 0FSH 100LY) causou a progressão da meiose, inibição da expulsão do corpúsculo polar, diminuição de E2 e aumento de P4. O meio inibiu a

expressão de *LHR*, *FSHR*, *CYP11A1*, *CYP19A1* e *HSD17B1*. Também houve diminuição da expressão de *GLUT4* e *G6PDH*.

No meio 10FSH há retomada e progressão da meiose e expulsão do corpúsculo polar, manutenção da produção de E2 e P4. Houve baixa expressão de *LHR*, *FSHR*, *CYP19A1* e *HSD17B1*. Além disso, houve aumento da expressão de *GLUT1*, *G6PDH*, *Bcl-2* e *Bax* e baixa expressão de *GLUT4* e *SNAP25*, em relação ao meio 0FSH.

A suplementação do inibidor (meio 10FSH 100LY) causou inibição da expulsão do corpúsculo polar e diminuição de E2. Houve aumento da expressão de *LHR* e *CYP19A1*, além da diminuição da *G6PDH* e *Bax*.

O gene *PDH* não sofreu modificação em nenhum dos tratamentos. *SNAP25*, *GLUT1* e *Bcl-2* não foram afetadas pelo LY294002.

Conclusões: O meio MIVB 0FSH é capaz de manter a esteroidogênese e a nutrição do CCOs, baseando-se na expressão gênica. A adição de FSH causa diminuição da expressão de genes importantes da esteroidogênese, mas aumenta os de sobrevivência e de metabolismo (*GLUT1* e *G6PDH*).

Além disso, a via PI3-K tem ações diferentes no meio com e sem FSH. No meio sem FSH, a via mantém a expressão dos genes esteroidogênese e metabolismo (*GLUT4* e *G6PDH*). No meio com FSH, inibe *LHR* e *CYP19A1* e mantém *G6PDH* e *Bax*.

#### **PALAVRAS-CHAVE:**

Complexo *cumulus* ovócito, MIV B, FSH, PI3-K, meiose, esteroidogênese, nutrição do CCO, viabilidade celular.

## ABSTRACT

**Introduction:** The maturation of *cumulus* oocyte complex (COC) *in vitro* depends on culture medium environment and it is a widely used biotechnology to produce bovine embryos for livestock production. The developmental biology of oocyte involves nuclear maturation, steroidogenesis, apoptosis and nutrition of COC, with central role of *cumulus* cells. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) pathway controls the parameters cited previously, making PI3-K pathway relevant for the COC biology. The aim of the present work was to study those parameters to elucidate biology functions of a defined medium MIV B (patent medium of the lab) and the addition of 10 ng/mL of FSH. To infer the PI3-K role, its inhibitor (LY294002) was used in COC culture.

**Methods:** Bovine ovaries were obtained at abattoirs and COC were aspirated for 22–24 hours of culture. The CCOs were allocated in the following experimental groups, using the MIV B: 0FSH; 0FSH 10LY (+10  $\mu$ M LY294002); 0FSH 100LY (+100  $\mu$ M LY294002); 10FSH; 10FSH 10LY or 10FSH 100LY. After preliminary results the 10  $\mu$ M of LY294002 were excluded because did not show effect. Androstenedione was supplemented to sustain steroidogenesis. After culture, COC were denuded and *cumulus* cells were isolated to subsequent evaluations.

Resumption and progression of nuclear maturation, polar body extrusion, and steroid hormones final concentration 17 beta-estradiol (E2) and progesterone (P4) were evaluated. The *cumulus* cells were analyzed to determine gene expression, for PCR real time, of proteins involved in steroidogenesis (*LHR*, *FSHR*, *CYP11A1*, *CYP19A1* and *HSD17B1*), apoptosis (*Bax*), cell survival (*Bcl-2*), and nutrition of CCO (*GLUT1*, *GLUT4*, *PDH*, *G6PDH* and *SNAP25*).

**Results:** MIV B 0FSH leads to immature nuclear status and low rates of polar body extrusion. However, the medium maintained the E2 and P4 values in culture media and expression of receptor of FSH and LH and of steroidogenic enzymes, mimetizing a growing ovarian follicle. 0FSH group presented low expression of *Bax*, *Bcl-2* and *GLUT1* and high levels of *G6PDH* and *SNAP25*.

The addition of inhibitor (0FSH 100LY group) caused the meiosis progression, inhibition of polar body extrusion, decrease of E2 and enhance of P4 levels. The medium also decreased the *LHR*, *FSHR*, *CYP11A1*, *CYP19A1* and *HSD17B1* gene expression. *GLUT4* and *G6PDH* expression were also inhibited by the medium.

In the 10FSH medium the levels of resumption and progression of meiosis and polar body extrusion were higher, and E2 and P4 levels were maintained. *LHR*, *FSHR*, *CYP19A1* and *HSD17B1* expression were inhibited. In addition, the expression of *GLUT1*, *G6PDH*, *Bcl-2* and *Bax* were stimulated and *GLUT4* and *SNAP25* were inhibited in comparison to 0FSH.

The supplementation of inhibitor (10FSH 100LY group) prevented polar body extrusion and decreased E2 values. There was an increase of *LHR* and *CYP19A1*, and decrease of *G6PDH* and *Bax* expression.

*PDH* gene expression did not change after culture treatments. *SNAP25*, *GLUT1* and *Bcl-2* expression were not affected by the LY294002.

Conclusion: In conclusion, the MIV B 0FSH was able to maintain steroidogenesis and the nutrition of COC, based on gene expression. The addition of FSH caused a diminishing of gene expression of steroidogenesis, however improves those related to cell survival and metabolism (*GLUT1* and *G6PDH*).

Furthermore, PI3-K pathway demonstrates different action in the medium with and without FSH. The medium without FSH, the pathway maintains steroidogenesis and metabolism (*GLUT4* and *G6PDH*). The medium with FSH inhibits *LHR* and *CYP19A1* and maintains *G6PDH* and *Bax*.

**KEY WORDS:**

*Cumulus* oocyte complex, MIV B, FSH, PI3-K, meiosis, steroidogenesis, COC nutrition, cell viability.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características que permitem a classificação dos ovócitos segundo o seu estágio de maturação nuclear.

Tabela 2: Desenhos dos primers e o código GenBank para cada transcrito da espécie *Bos taurus*.

Tabela 3: Expansão das células do *cumulus* em cada grupo experimental testado comparado ao CCO imaturo e ao cultivado na presença de soro.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via de sinalização da proteína PI 3-K classe IA e classe IB.

Figura 2: Via de sinalização da PI3-K, suas proteínas-alvo e funções intracelulares.

Figura 3: Tubo Falcon contendo fluido folicular e pellet contendo os CCOs aspirados de folículos entre 2 e 8 mm.

Figura 4: Complexo *cumulus* ovócito (CCO) imaturo (A) e grau I (B).

Figura 5: Fórmula química do inibidor da proteína PI 3-K, a molécula LY294002.

Figura 6: Estágios da maturação nuclear de ovócitos bovinos corados com orceína.

Figura 7: Ovócitos antes e após o desnudamento (retirada total das células do *cumulus*).

Figura 8: Ovócitos desnudos evidenciando a presença (A) ou ausência (B) de corpúsculo polar.

Figura 9: Expansão das células do *cumulus* de CCOs antes do cultivo e após exposição a diferentes meios de MIV.

Figura 10: Efeito *in vitro* do FSH (10 ng/mL) na maturação nuclear de ovócitos bovinos em meio definido MIV B.

Figura 11: Taxa de maturação nuclear de ovócitos cultivados em crescentes doses do inibidor LY294002, na ausência de FSH (A) ou na presença de 10 ng/mL de FSH (B).

Figura 12: Efeito do inibidor LY294002 10  $\mu$ M (A) ou 100  $\mu$ M (B) sobre a taxa de maturação nuclear no meio definido MIV B sem ou com 10 ng/mL de FSH.

Figura 13: Taxa de maturação nuclear no meio contendo FSH *versus* meio 0FSH 100LY.

Figura 14: Efeito do LY294002 100  $\mu$ M sobre a expulsão do corpúsculo polar de ovócitos cultivados no meio MIV B na ausência ou na presença 10 ng/mL de FSH.

Figura 15: Expressão gênica relativas às proteínas Bcl-2 e Bax de células do *cumulus* provenientes de CCOs cultivados com e sem FSH e sob a presença ou ausência do inibidor da PI-3K (LY294002).

Figura 16: Razão Bcl-2/Bax de células do *cumulus* provenientes de CCOs cultivados com e sem FSH e sob a presença ou ausência do inibidor da PI-3K (LY294002).

Figura 17: Via de síntese e enzimas-chave de hormônios esteróides sexuais e a teoria das duas células, duas gonadotrofinas.

Figura 18: Efeito da presença de 10 ng/mL de FSH sobre a concentração final de 17 beta-estradiol (A), progesterona (B) e relação E2/P4 (C) após cultivo de CCOs bovinos em MIV B.

Figura 19: Concentração de 17 beta-estradiol nos meios de cultura de CCOs bovinos na presença ou ausência de FSH e sob diferentes doses do inibidor LY294002.

Figura 20: Concentração de progesterona nos meios de cultura de CCOs bovinos na presença ou ausência de FSH e sob diferentes doses do inibidor LY294002.

Figura 21: Razão E2/P4 nos meios de cultura de CCOs bovinos na presença ou ausência de FSH e sob diferentes doses do inibidor LY294002.

Figura 22: Correlação entre produção de 17 beta-estradiol ou progesterona e expulsão do corpúsculo polar dos ovócitos após cultivo de CCOs *in vitro*.

Figura 23: Expressão gênica dos receptores de LH e FSH de células do *cumulus* provenientes de CCOs cultivados com e sem FSH e sob a presença ou ausência do inibidor da PI-3K (LY294002).

Figura 24: Expressão gênica das enzimas *CYP11A1*, *CYP19A1* e *HSD17B1* de células do *cumulus* provenientes de CCOs cultivados com e sem FSH e sob a presença ou ausência do inibidor da PI-3K (LY294002).

Figura 25: Metabolismo intermediário da glicose e a integração entre as células do *cumulus* e ovócito.

Figura 26: Expressão gênica dos transportadores de glicose GLUT1 e GLUT4 de células do *cumulus* provenientes de CCOs cultivados com e sem FSH e sob a presença ou ausência do inibidor da PI-3K (LY294002).

Figura 27: Expressão gênica das enzimas G6PDH e PDH de células do *cumulus* provenientes de CCOs cultivados com e sem FSH e sob a presença ou ausência do inibidor da PI-3K (LY294002).

Figura 28: Perfil da taxa de expulsão do corpúsculo em comparação à expressão gênica do GLUT1, GLUT4 e G6PDH de células do *cumulus* de CCOs cultivados com e sem FSH e sob a presença ou ausência do inibidor da PI-3K (LY294002).

Figura 29: Expressão gênica relativas à proteína SNAP25 em células do *cumulus* provenientes de CCOs cultivados com e sem FSH e sob a presença ou ausência do inibidor da PI-3K (LY294002).

## LISTA DE SIGLAS

2-DG: 2-deoxi glicose

AGT: aminoglutetimida

Akt: serina/treoninaproteína cinase (ou PKB)

ANOVA: análise de variância

ATP: adenosina trifosfato

ATPC: ATP citrato liase

Bax: proteína X associada à família Bcl-2

Bcl-2: B cell lymphoma/leukaemia-2

Bim: Bcl-2 like-11

BMP15: proteína óssea morfogenética 15

BSA: albumina sérica bovina

cAMP: adenosina monofosfato cíclico

CCO: complexo *cumulus*-ovócito

CDK1: cinase dependente de ciclina I

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

CEUA: Comitê de Ética no Uso Animal

cGMP: guanosina monofosfato cíclico

CYC: ciclofilina A

CYP11A1: enzima que cliva a cadeia lateral do colesterol

CYP17: enzima 17alfa-hidroxilase/ C17,20-liase

CYP19: enzima aromatase

CYP19A1: enzima aromatase

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados

E2: 17 beta-estradiol

F-actina: actina filamentosa

FSH: hormônio folículo estimulante

FSHR: receptor de hormônio folículo estimulante

G6Pase: glicose 6-fosfatase

G6PDH: glicose 6-fosfato desidrogenase

GDF9: fator de crescimento e diferenciação 9

GLUT1: Transportador facilitado de glicose do tipo I  
GLUT4: Transportador facilitado de glicose do tipo 4  
GSH: glutathiona reduzida  
GSK-3: glicogênio sintase cinase-3  
GSSG: glutathiona oxidada  
hCG: gonadotrofina coriônica humana  
HSD17B: 17 beta-hidroxiesteróide desidrogenase  
HSD17B1: 17 beta-hidroxiesteróide desidrogenase 1  
HSD3B: 3 beta-hidroxiesteróide desidrogenase  
HSP: proteínas de choque térmico  
IA: inseminação artificial  
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina  
LH: hormônio luteinizante  
LHR: receptor de hormônio luteinizante  
LY294002: hidrocloreto [2-(4-morpholinil)-8-fenil-1(4H)-benzopiran-4-one hidrocloreto]  
MAPK: proteína cinase ativadora de mitógenos  
MCL-1: célula mielóide de leucemia sequência 1  
Mg<sup>2+</sup>: magnésio  
MIV B: meio base de maturação *in vitro*  
MIV C: meio completo de maturação *in vitro*  
MIV: maturação *in vitro*  
mL: mililitros  
MPF: fator promotor de maturação  
mRNA: ácido ribonucléico mensageiro  
NADPH: fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido  
ng: nanogramas  
P4: progesterona  
PBS: solução tampão fosfato  
PDH: complexo enzimático piruvato desidrogenase  
PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK)  
PH: *phox homology*  
PH: *pleckstrin homology*

PI3-K: fosfatidilinositol 3-cinase  
PIP2: fosfatidilinositol difosfato  
PIP3: fosfatidilinositol trifosfato  
PIVE: produção *in vitro* de bovinos  
PKA: proteína cinase dependente de cAMP  
PVA: álcool polivinílico  
qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real  
RIN : número de integridade do RNA  
RNA: ácido ribonucléico  
SAC: spindle assembly checkpoints  
SNAP25: proteína associada ao sinaptossoma 25  
SNARE: proteínas de membrana associadas a vesículas  
UV: ultravioleta  
PVA: álcool polivinílico  
VG: vesícula germinativa  
VGBD: quebra da vesícula germinativa  
µg: microgramas  
µL: microlitros

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1 A via de sinalização da proteína PI 3-K e sua relação com os processos biológicos do CCOs.....	25
2.2 Meios patenteados de maturação <i>in vitro</i> de CCOs MIVC e MIV B.....	30
3. OBJETIVO.....	33
3.1 Objetivo geral.....	33
3.1 Objetivos específicos.....	33
4. MÉTODOS.....	34
4.1 Seleção morfológica dos CCOs viáveis para cultura.....	35
4.2 Meios de cultura de maturação <i>in vitro</i> (MIV) de CCOs.....	36
4.3 Diluição da molécula LY294002, o inibidor da proteína PI 3-K.....	37
4.4 Avaliação da expansão das células do <i>cumulus</i> dos CCOs após o cultivo.....	37
4.5 Avaliação da taxa de maturação nuclear dos ovócitos após a MIV.....	38
4.6 Dosagem de hormônios esteróides após cultivo dos CCOs <i>in vitro</i> .....	40
4.7 Isolamento e armazenamento das células do <i>cumulus</i> para PCR <i>real time</i> .....	41
4.8 Isolamento do transcrito (RNA) total.....	41
4.9 Síntese do DNA complementar (cDNA).....	42
4.10 Padronização das condições de PCR <i>real time</i> (qPCR) para detecção dos genes de interesse.....	43
4.11 Grupos experimentais utilizados no cultivo dos CCOs <i>in vitro</i> .....	46
4.12 Delineamento experimental.....	46
4.13 Análise estatística.....	48
4.14 Aprovação pelo comitê de ética.....	49
4.15 Conflito de interesses.....	49

**CAPÍTULO I**

Maturação nuclear do ovócito e viabilidade das células do *cumulus*

Ação da via PI3-K em meio definido patentado suplementado ou não com FSH

INTRODUÇÃO.....	51
RESULTADOS.....	55
DISCUSSÃO.....	67

**CAPÍTULO II**

Esteroidogênese das células do *cumulus* e expulsão do corpúsculo polar

Ação da via PI3-K em meio definido patentado suplementado ou não com FSH

INTRODUÇÃO.....	74
RESULTADOS.....	78
DISCUSSÃO.....	87

**CAPÍTULO III**

Expressão de proteínas-chave da nutrição do CCO em células do *cumulus*

Ação da via PI3-K em meio definido patentado suplementado ou não com FSH

INTRODUÇÃO.....	94
RESULTADOS.....	101
DISCUSSÃO.....	106
CONCLUSÕES.....	111
REFERÊNCIAS.....	113

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 8,9 milhões de cabeças de gado bovino foram abatidos no Brasil e 326.543 toneladas de carne *in natura* foram exportadas entre julho e setembro de 2013 (IBGE, 2013). Ainda segundo esse mesmo relatório de avaliação da produção pecuária no Brasil, houve aumento do abate de bovinos entre 2008 e 2013.

Com relação à produção de leite, o Brasil produziu 5,989 bilhões de litros no 3º trimestre de 2013 (IBGE, 2013). Ainda, segundo o Ministério da Agricultura (2013), o Brasil lidera o *ranking* como maior exportador de carne bovina do planeta. Portanto, nota-se a enorme importância social e econômica da produção de gado para o Brasil o que explica a crescente busca por biotecnologias nas áreas de produção e reprodução animal.

As biotecnologias relacionadas à reprodução de bovinos mais utilizadas no Brasil são a inseminação artificial (IA), aliada a protocolos de superestimulação ovariana, e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) a partir de ovócitos coletados de fêmeas doadoras, aliada a transferência desses embriões para vacas receptoras também hormonalmente tratadas. A PIVE responde por 70% do total de transferências de embriões bovinos e permitiu ao Brasil atingir a cifra de mais de 250.000 embriões transferidos em 2006 (VIANA e CAMARGO, 2007). A expansão da atividade resultou no aumento na participação relativa do país no total de transferências realizadas no mundo. O Brasil responde por aproximadamente 25% do total global, o que o tornou referência e líder nessa área (THIBIER, 2007).

A PIVE pode ser a primeira opção de escolha para a geração de embriões de interesse comercial pecuário. No Brasil, há o predomínio do gado Nelore nos rebanhos e nessa raça gera-se maior número de embriões por procedimento de PIVE (SENEDA *et al.*, 2007; NONATO JUNIOR *et al.*, 2004). Entretanto, há limitações como a baixa eficiência relativa da PIVE, considerando-se as taxas médias de embriões (20 a 50%) e gestações (30 a 40%) obtidas (CAMARGO *et al.*, 2006). Portanto, podemos partir da premissa de que ovócitos, espermatozóides e embriões não conseguem expressar sua máxima competência fora de seus respectivos ambientes *in vivo*.

Têm-se vários pontos-chave no melhoramento das biotecnologias reprodutivas: a nutrição e o perfil endócrino dos animais doadores; o desenvolvimento folicular e o perfil maturacional do ovócito aí contido; o

desenvolvimento e amadurecimento dos espermatozóides; o processo de fecundação e a finalização da segunda meiose; o processo de desenvolvimento embrionário, bem como sua nutrição *in vitro* ou *in vivo*; a transferência do embrião e sua implantação uterina; e a gestação e o nascimento de um animal saudável.

Com relação ao desenvolvimento do ovócito e do embrião, esses processos podem ser, parcialmente, mimetizados ou adaptados às condições *in vitro* através da manipulação da composição dos meios de cultivo nos quais esses tipos celulares se desenvolverão. Meios de cultivo adequados também permitem o estudo de fatores determinantes da aquisição de competência dessas células.

A presença de soro, muito comumente usado em meios de cultura comerciais, é um fator determinante para alterações de funções fisiológicas *in vitro*, como a luteinização das células foliculares (CHANNING, 1970). Meios definidos e sem de soro são alternativas viáveis para preservar a fisiologia das células, além de diminuir a interferência de fatores não conhecidos presentes no soro fetal bovino (SFB).

Partindo das premissas de que o amadurecimento do ovócito e os meios de cultura são essenciais aos melhoramentos biotécnicos, o Laboratório de Biotecnologia da Reprodução patenteou meios de maturação *in vitro* (MIV) de complexo *cumulus*-ovócito (CCO), denominados de MIV C e MIV B [número de IP 0803140-1, em nome da Fundação Universidade de Brasília]. O MIV B obteve resultados promissores pois obtém-se as mesmas taxas de produção de embrião quando comparado a um meio comercialmente utilizado para MIV de bovinos (GULART, 2009). O MIV B é considerado um meio definido, pois as concentrações de todos os componentes são conhecidas e não há a presença de soro nem de albumina sérica bovina (BSA).

O meio MIV B também é capaz de permitir a progressão da maturação do ovócito em termos de modificações do citoplasma, que são importantes para a fertilização e a geração de embrião, enquanto impede a maturação do núcleo, ou seja, a finalização da meiose (OLIVEIRA e SILVA, 2013).

Assim, o estudo dos CCOs *in vitro* auxiliará no entendimento dos processos fisiológicos relacionados à competência ovocitária e na determinação dos efeitos dos componentes do meio definido desenvolvido e patenteado pelo nosso laboratório.

Quanto à biologia do amadurecimento do ovócito como fator limitante para a produção de embriões de boa qualidade, sabe-se que alguns parâmetros para a determinação da competência do ovócito são as taxas de finalização da meiose,

esteroidogênese e perfil metabólico dos CCOs. Esses parâmetros são fortemente influenciados pelo hormônio folículo estimulante (FSH) e pela via de sinalização intracelular fosfatidilinositol 3-cinase (PI3-K). O entendimento da ação dos componentes do meio na modulação das vias intracelulares relacionados aos parâmetros anteriormente mencionados também é crucial.

O presente trabalho visa contribuir significativamente na busca de biotécnicas para melhorar as técnicas de maturação e, conseqüentemente, melhorar as taxas e a qualidade dos embriões bovinos gerados *in vitro*.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A reprodução é uma das etapas fundamentais que permite a passagem de características genéticas aos descendentes, visando a variabilidade da população e a perpetuação da espécie. Os gametas feminino e masculino são parte essencial nesse processo e a manutenção de sua viabilidade depende do ganho e amadurecimento de sua capacidade biológica. O ovócito, célula germinativa feminina, passa por um período de maturação nos folículos ovarianos no qual adquire competência, ou seja, capacidade de fertilização, de gerar embrião e permitir o nascimento de um filhote saudável.

O folículo ovariano, unidade funcional e fundamental do ovário de mamíferos, possui função gametogênica e esteroidogênica. O folículo é composto por três tipos celulares: o ovócito, célula germinativa, envolto por células somáticas, denominadas de células da granulosa e da teca. As células somáticas são responsáveis pela produção de esteróides sexuais, maturação e nutrição do ovócito. O ovócito está firmemente aderido às células da granulosa que o circundam e são chamadas de células do *cumulus*, compondo assim o complexo *cumulus*-ovócito (CCO) (McGEE *et al.*, 2000).

*In vivo*, a meiose ovocitária permanece parada no início da primeira meiose até a puberdade (TRIPATHI *et al.*, 2010). A partir da maturação sexual, a ação das gonadotrofinas [hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH)], bem como da ação de outros hormônios e fatores de crescimento de ação endócrina e parácrina, recruta e seleciona folículos ovarianos, o que leva à maturação e ovulação de um ovócito competente por ciclo (ORISAKA *et al.*, 2009).

Em bovinos, há 2 ou 3 ciclos de crescimento, induzidos pelo FSH, de um *pool* de folículos ovarianos que se desenvolvem dando origem a vários folículos antrais, sendo que, nos primeiros 1 a 2 ciclos, respectivamente, há atresia dos folículos e não há ovulação. Apenas no último ciclo ocorre crescimento de folículos antrais até a emergência de um folículo dominante e vários subordinados, sendo o folículo dominante ovulado (FORTUNE *et al.*, 2001).

Diversos hormônios estão envolvidos nesse processo bem como sinais parácrinos intraovarianos, incluindo fatores produzidos pelo próprio ovócito. Uma das características marcantes é o perfil esteroidogênico do folículo dominante (FORTUNE *et al.*, 2001), pois há marcadores moleculares da esteroidogênese que são utilizados para determinar e diferenciar folículos em crescimento dos em atresia.

Por exemplo, a presença do mRNA do receptor de LH e FSH, bem como das enzimas *CYP11A1*, *CYP17* e *CYP19* aumenta com o aumento do tamanho e o estágio de desenvolvimento do folículo ovariano (BAO *et al.*, 1997).

A maturação nuclear, que corresponde à finalização da meiose, *in vivo* é induzida pelo pico de LH. Porém, *in vitro* esta ocorre espontaneamente quando os ovócitos são removidos do folículo e colocados em meio de cultivo. Isto ocorre quando os CCOs são removidos do ambiente folicular e há a perda do contato com as células da granulosa do folículo com as quais estabelecia comunicação através de junções comunicantes (BYSKOV *et al.*, 1997). O rompimento desta barreira leva a maturação nuclear, permitindo que a meiose que estava bloqueada em prófase I progrida até metáfase II (EDWARDS, 1965). Esse processo de maturação nuclear acelerada causada pela retirada do CCO do folículo impede a correta maturação citoplasmática e molecular. Isso significa que o ovócito não realizará mudanças como rearranjo de organelas (FAIR *et al.*, 1997) e síntese e acúmulo de proteínas e ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) (WU *et al.*, 1996) que são cruciais para sua competência.

A maturação do ovócito, portanto, corresponde a dois passos inter-relacionados e integrados: a maturação nuclear e a citoplasmática. A primeira corresponde à finalização da meiose (TRIPATHI *et al.*, 2010) e a última envolve a redistribuição das organelas citoplasmáticas, rearranjo do citoesqueleto e maturação molecular (FERREIRA *et al.*, 2009). A maturação molecular é caracterizada pela transcrição de genes e a tradução de proteínas necessárias aos processos celulares do ovócito e ao desenvolvimento embrionário inicial. Portanto, técnicas que avaliem a expressão diferencial dos genes das mais variadas funções celulares podem ser utilizadas para determinação da base molecular da maturação ovocitária (WRENZYCKI *et al.*, 2007).

A maturação *in vitro* de ovócitos é uma biotécnica usualmente empregada para PIVE de bovinos e para posterior transferência para fêmeas receptoras. Baseando-se nessa premissa, visa-se o melhoramento da maturação *in vitro* de ovócitos para o melhoramento de rebanhos bovinos, cuja importância econômica é indiscutível. Assim, a elaboração de meios de MIV que melhorem as biotécnicas reprodutivas para alcançar maior qualidade ovocitária é de fundamental importância na produção de embriões capazes de se implantar e gerar fetos saudáveis (SIRARD *et al.*, 2006).

Em boa parte dos meios de cultura utilizados nos estudos supracitados há a suplementação de soro fetal, que contém uma série de componentes não conhecidos e/ou não quantificados que impedem o entendimento da ação de cada item a ser suplementado e que, também, podem trazer alterações fisiológicas ao CCO, como por exemplo, alteração dos padrões de expressão gênica (CALDER *et al.*, 2005). Logo, meios definidos e ausentes de soro são fundamentais para o desenvolvimento de biotecnologias que melhorem a qualidade dos CCOs *in vitro*.

## **2.1 A via de sinalização da proteína PI3-K e sua relação com os processos biológicos do CCOs**

As proteínas da família fosfatidilinositol 3-cinases (PI3-K, sigla em inglês para a expressão *phosphatidylinositol 3-kinase*) são um conjunto de proteínas cinases que são capazes de fosforilar o grupo 3'-hidroxil do grupo inositol presente em moléculas lipídicas como fosfatidilinositóis, usualmente localizados em membranas celulares (HAWKINS *et al.*, 2006; VANHAESEBROECK *et al.*, 2010; ENGELMAN, LUO e CANTLEY, 2006). Esse tipo de fosforilação aproxima da membrana uma série de proteínas que possuem afinidade por essa estrutura, que são as proteínas que contém domínios específicos denominados *pleckstrin homology* (PH) ou domínios PH; *phox* (PX) *homology* ou domínios PX; e domínios FYVE, que correspondem a regiões específicas de proteínas de sinalização celular que possuem afinidade por ligações do tipo 3'-fosfoinosítídeo (VANHAESEBROECK *et al.*, 2010).

O recrutamento de proteínas que contém os domínios protéicos supracitados estimula diversas outras, até então inativas, a ancorarem-se e desencadear uma sinalização celular bastante complexa e parcialmente compreendida que modula metabolismo intermediário, crescimento e sobrevivência celular, migração celular, tráfico intracelular de vesículas e ciclo celular (VANHAESEBROECK *et al.*, 2010; ENGELMAN, LUO e CANTLEY, 2006). Assim, os lipídios 3'-fosforilados funcionam como um ponto de ancoramento para proteínas de sinalização intracelular (CANTLEY, 2002) (Figura 1) ligados a hormônios, fatores de crescimento, fatores inflamatórios, neurotransmissores e antígenos (HAWKINS *et al.*, 2006).

A família da proteína PI3-K é dividida em três classes de acordo com seu substrato de fosforilação preferencial e homologia de sequências (HAWKINS *et al.*, 2006; ENGELMAN, LUO e CANTLEY, 2006). A classe I é ligada a receptores de

membrana; a classe II parece estar ligada a internalização de receptores, migração celular, controle do metabolismo da glicose, excitação, contração de células musculares lisas e apoptose; e a classe III parece ligada a transporte intracelular do aparato de Golgi, controle de crescimento celular e autofagia. Entretanto as classes II e III ainda são pouco compreendidas, não excluindo a possibilidade de também estarem associadas a receptores de membrana (VANHAESEBROECK *et al.*, 2010; ENGELMAN, LUO e CANTLEY, 2006).

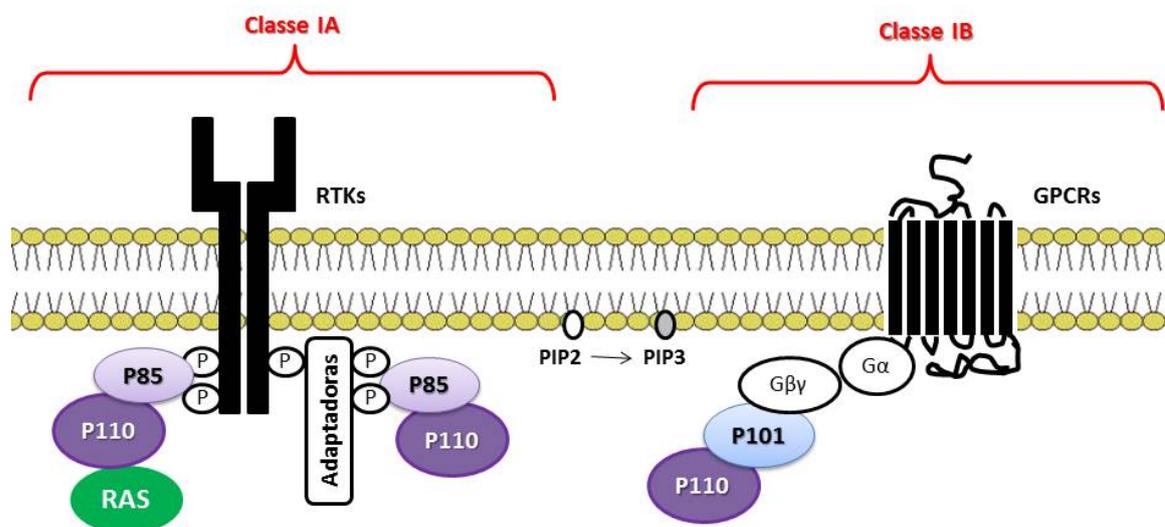
A classe I é a classe cuja função é associada mais claramente à receptores de membrana e é dividida em duas subfamílias: a classe IA, que está ligada a receptores relacionados a fatores de crescimento, como por exemplo, os receptores tirosina cinase; e a classe IB, ligada a receptores acoplados a proteína G (HAWKINS *et al.*, 2006; ENGELMAN, LUO e CANTLEY, 2006) (Figura 1). Porém, também não se exclui a possibilidade de que a PI3-K de classe IA também seja ativada por receptores acoplados a proteína G por meio da proteína de sinalização denominada Ras (VANHAESEBROECK *et al.*, 2010).

A classe IA da PI3-K utiliza como subunidade regulatória, ou seja, proteína regulatória capaz de estabilizar, inibir a atividade em estado basal e recrutar outras proteínas adaptadoras, a proteína p85, enquanto a classe IB não (VANHAESEBROECK *et al.*, 2010). As subunidades catalíticas, denominadas de p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\gamma$  e p110 $\delta$ , promovem a ativação de proteínas de sinalização intracelular que modulam as funções celulares supracitadas (VANHAESEBROECK *et al.*, 2010; ENGELMAN, LUO e CANTLEY, 2006).

Deve-se salientar que existem inúmeras outras formas de ativação da via PI3-K por parte dos receptores de membrana e nem todas serão descritas no presente trabalho, visto que, muitas descobertas de possíveis interações ainda continuam a ser publicadas na literatura (VANHAESEBROECK *et al.*, 2010).

A PI3-K está envolvida em uma série de vias metabólicas de anabolismo (lipogênese, síntese de proteínas e de glicogênio) e modula a expressão gênica de proteínas relacionadas ao crescimento e à replicação celular, diferenciação, rearranjo do citoesqueleto, inibição da apoptose, metabolismo celular, além da finalização da meiose de CCOs em cultivo (ROBERTS *et al.*, 2004; SALTIEL & KAHN, 2001; HOSHINO *et al.*, 2004; PROCHAZKA, BLAHA e NEMCOVA, 2012) (Figura 2).

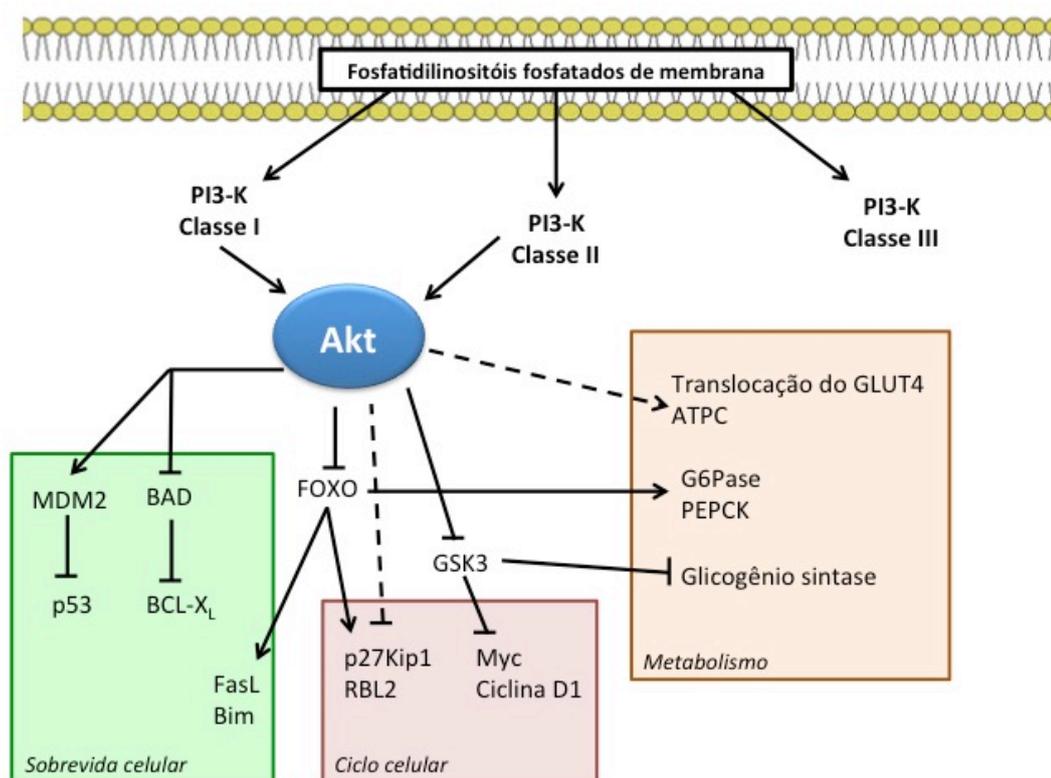
A ação do FSH dá-se através de receptores acoplados à proteína G, ativando várias vias intracelulares ligadas à rota da proteína cinase ativada por AMP cíclico (PKA) e também ativando a via da proteína fosfatidilinositol-3 cinase (PI3-K) (ENGELMAN, LUO e CANTLEY, 2006; ROBERTS *et al.*, 2004; ZHENG *et al.*, 2012; PROCHAZKA, BLAHA e NEMCOVA, 2012; SUN, MIAO e SCHATTEN, 2009).



**Figura 1: Via de sinalização da proteína PI 3-K classe IA e classe IB.**

Na figura observa-se um receptor da família tirosina cinase (**RTKs**) e um ligado à proteína G (**GPCRs**). Nos receptores **RTKs**, observa-se a auto-fosforilação do receptor (indicado pela letra P) seguido do ancoramento e ativação da proteína PI3-K através da subunidade regulatória p85 e da subunidade catalítica p110, ou da presença de proteínas adaptadoras (não mostradas na figura, como a proteína IRS1) seguido do ancoramento da PI3-K (proteínas p85 e p110). Já nos receptores **GPCRs** observa-se que a subunidade beta-gama-proteína G ( $G\beta\gamma$ ) é responsável por ancorar e ativar a subunidade regulatória p87 (não mostrada) ou p101e a subunidade catalítica p110 $\beta$  (não mostrada) ou p110 $\gamma$ . Algumas evidências também apontam a interação com as proteínas Ras que seria responsável pela possível ativação das PI3-K de classe IA (informação não demonstrada na figura). A proteína Ras é responsável pela ativação da via MAPK.

A PI3-K fosforila lipídios de membrana (converte PIP2 em PIP3, por exemplo) o que leva à atração de várias proteínas, não mostradas na figura, que fazem parte da sinalização, como a proteína Akt/PKB. Modificado de ENGELMAN, LUO e CANTLEY, 2006; ANDREWS, STEPHENS e HAWKINS, 2007; VANHAESEBROECK *et al.*, 2010.



**Figura 2: Via de sinalização da PI3-K/Akt, suas proteínas-alvo e funções intracelulares.**

Na figura indica-se as vias principais das PI3-K da classe I e II e sua interrelação com a proteína Akt. Não está mostrado na figura, mas há outras proteínas, como a via MAPK, que pode ser controlada pela via PI3-K, por meio da proteína Ras.

A proteína Akt controla: 1. A sobrevivência celular por inibir vias que levam à apoptose (exemplo: BCL-K<sub>L</sub>, BAD, FasL e Bim); 2. Promove a transição do ciclo celular do estágio G1 para S através da inibição de proteínas que inibem esse processo; 3. Controla o metabolismo intermediário, pois desinibe a síntese de glicogênio – mediada pela enzima glicogênio sintase –, bloqueia a gliconeogênese – mediada pelas enzimas glicose 6-fosfatase (G6Pase) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) – e permite a translocação do transportador de glicose GLUT4 e ativa a enzima que sintetiza ácidos graxos ATP citrato liase (ATPC).

⊥ Indica via de inibição; ↓ indica via de estimulação; | indica que há outros passos intermediários.

Modificado de ENGELMAN, LUO e CANTLEY, 2006

Apesar da ação mais estudada do FSH ser sobre a via da proteína cinase dependente de cAMP (PKA), a relevância fisiológica da via PI3-K é inegável, pois ela controla uma série de eventos fisiológicos relevantes aos processos de maturação ovocitária e geração de embrião. Portanto, o entendimento das ações intracelulares da PI3-K, e sua interrelação com as ações do FSH, é de fundamental importância no entendimento dos processos reprodutivos *in vitro* envolvendo CCOs bovinos em cultivo.

A via PI3-K já foi descrita como menos importante do que moléculas como o cAMP para a finalização da meiose em mamíferos (ZHENG *et al.*, 2012), porém o uso de doses crescentes de inibidores dessa proteína em meio de maturação de CCO, tais como o LY294002 e de wortamina, indica que essa via de sinalização é indispensável para a finalização da primeira meiose em ovócitos bovinos (ANAS *et al.*, 1998; HOSHINO *et al.*, 2004; PROCHAZKA *et al.*, 2012). Além disso, está associada ao rearranjo de microtúbulos do citoesqueleto e formação do fuso meiótico, levando à divisão e à segregação dos cromossomos (WANG *et al.*, 2003).

CCOs cultivados na presença do inibidor da via cAMP/PKA são inibidos de progredir a meiose até metáfase II, mesmo na presença de FSH. Já o cultivo com o inibidor LY294002 permitiu a progressão da meiose até metáfase I, porém uma porcentagem pequena atingiu metáfase II (menos de 20%) (PROCHAZKA, BLAHA e NEMCOVA, 2012). Alguns dos efeitos obtidos em termos de maturação nuclear devem-se a ação da MAPK, que é ativada pelo FSH, e pode ter relação tanto com a via PKA quanto com a via PI3-K, pois a inibição da MAPK impede a progressão da meiose na presença de FSH (PROCHAZKA, BLAHA e NEMCOVA, 2012).

Outra questão importante em termos de maturação nuclear é a expulsão do corpúsculo polar. A expulsão do corpúsculo depende da produção de fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (PIP3), produzido por proteínas cinases de fosfolipídeos, como a PI3-K. A inibição da produção desses componentes, causado pela ação dos inibidores da PI3-K, LY294002 ou wortmanina, causa desorganização da actina filamentosa (F-actina) citoplasmática, mas não altera a F-actina do córtex do ovócito (ZHENG *et al.*, 2013). Também há alteração da translocação do fuso meiótico para o córtex do ovócito, local onde ocorre a divisão celular e extrusão do primeiro corpúsculo polar. Em torno de 43,3% dos ovócitos possuíam fuso meiótico no córtex do ovócito enquanto 39,4% apresentaram fuso central após cultivo com

inibidor da PI3-K (ZHENG *et al.*, 2013). Logo, conclui-se que a importância da via PI3-K para a translocação do fuso para o local correto da membrana.

O uso de inibidores da via PI3-K, como o LY294002 e a wortmanina, são úteis na inferência da ação dessa via sobre os processos biológicos em questão. Entretanto, os inibidores como a wortmanina e o LY294002 inibem todas as três classes da proteína PI3-K, bem como outras proteínas similares a PI3-K, portanto deve-se ter cautela ao analisar os efeitos *in vitro* desses inibidores (ENGELMAN, LUO e CANTLEY, 2006).

Pode-se concluir que, apesar dos avanços na compreensão da via PI3-K sobre a maturação do CCO, pouco foi investigado em relação a essa via e o controle de funções celulares relevantes, como a nutrição do ovócito, apoptose e esteroidogênese. Logo, o presente trabalho visa o estudo da ação da referida via sobre parâmetros nada ou pouco estudados na literatura de CCOs.

Como a via PI3-K possui ações sobre a expressão gênica, já que regula a ação de fatores de transcrição, o presente trabalho enfocará, em grande parte, a relevância dessa via sobre a expressão gênica. Assim, busca-se entender a importância desses parâmetros sobre a biologia dos CCOs.

## **2.2 Meios patenteados de maturação *in vitro* de CCOs MIV C e MIV B**

A variabilidade de competência de ovócitos até pode ser considerada um processo de seleção natural produzindo apenas seres capazes de sobreviver à pressão biológica, porém isso não é o suficiente e não pode ser um limitante para as técnicas reprodutivas. É de suma importância conhecer as variáveis que levam a esse processo de seleção para melhorar a capacidade dos sistemas de geração de embriões *in vitro* de bovinos.

Nosso laboratório desenvolveu um meio de cultura semi-definido suplementado com BSA no qual observou-se taxa de fertilização com menor índice de anomalias (poliploidias) e um desenvolvimento embrionário pré-implantação semelhante em porcentagem ao meio padrão utilizado na literatura (dados não publicados).

Posteriormente, ao substituir o BSA por álcool polivinílico (PVA) obteve-se um meio totalmente definido, o MIV C [meio patentado sob o número de IP08031140-1, também denominado de MEM C], que é capaz de retardar a maturação nuclear do ovócito, permitindo que a maturação citoplasmática avance *in vitro* (OLIVEIRA e

SILVA, 2008; OLIVEIRA e SILVA *et al.*, 2011). A produção de embriões no MIV C é menor quando comparado ao meio comercial e apenas a adição de FSH é capaz de elevar a produção de taxas semelhante de embriões (blastocistos) *in vitro* ao meio comercial (GULART, 2009).

Entretanto, Vireque e colaboradores (2009), obteve as mesmas taxas de produção de embriões no meio comercial comparado a meio similar ao meio patenteado e sem FSH, além de não apresentar diferenças na expressão de HSP-70 e Bax (VIREQUE *et al.*, 2009), que são marcadores de inviabilidade embrionária. Os resultados divergentes podem demonstrar a importância dos meios de cultivo de embriões sobre a viabilidade dessas células *in vitro*.

O meio MIV C também foi testado em modelo de cultura de hemisseções da parede de folículo antral (4–5 mm). Nesse modelo de co-cultivo, o meio MIV C causou o aumento da expressão das enzimas da esteroidogênese e do receptor de FSH, além de manter a produção de progesterona e 17 beta-estradiol, a morfologia das células e a presença de conexina-43 (VASCONCELOS, 2008; VASCONCELOS *et al.*, 2013). Esses dados demonstram que os folículos foram resgatados de uma possível atresia e mantidos como folículos saudáveis em cultura.

Diversos efeitos benéficos foram demonstrados com o MIV C, porém trabalhos descritos na literatura indicam que embriões metabolicamente menos ativos seriam mais viáveis (LEESE, 2012), o que levou ao teste de meios de cultivo de CCOs contendo menos aditivos hormonais. A ausência de fatores de crescimento e hormônios no meio, que nesse ponto da pesquisa originou o meio MIV B [meio patenteado e reserva de domínio da patente IP08031140-1, também denominado de MEM B], também é capaz de inibir a progressão da meiose (MOTA *et al.*, 2014; OLIVEIRA e SILVA, 2013). A ausência de hormônios no meio de cultivo de CCOs foi suficiente para produzir a mesma quantidade de embriões que o controle contendo soro, independentemente da presença ou ausência de FSH (GULART, 2009).

Todas as evidências encontradas suscitaram novos questionamentos de como se dá o processo de desenvolvimento biológico do ovócito até a formação do blastocisto *in vitro*. Portanto, a maturação do CCO *in vitro* é um dos objetos mais importantes e mais estudados pela nossa linha de pesquisa e o presente trabalho pretende elucidar como o meio pode modular a expressão gênica de proteínas importantes para o desenvolvimento ovocitário.

A via PI3-K nunca foi investigada utilizando os meios patenteados, logo tornou-se um foco de estudo importante por sua relação com eventos metabólicos e anti-apoptóticos (SALTIEL & KAHN, 2001; ENGELMAN, LUO e CANTLEY, 2006). Como os melhores resultados obtidos em termos de produção de embrião *in vitro* foram alcançados com o MIV B, esse meio foi o escolhido para os testes aqui apresentados.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a participação da via PI3-K, inferida através do uso do inibidor LY294002, tanto no meio MIV B quanto no meio MIV B suplementado com 10 ng/mL de FSH na maturação do CCOs bovinos *in vitro*.

#### 3.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da via PI3-K no meio MIV B, com e sem a presença do FSH, no cultivo de CCOs *in vitro*. Alguns parâmetros de competência dos CCOs foram realizados para:

- 1) Avaliar a expansão das células do *cumulus* dos CCOs cultivados;
- 2) Determinar a retomada e progressão do estágio de maturação nuclear (estágio da meiose) de ovócitos isolados do CCOs cultivados *in vitro*;
- 3) Estabelecer a proporção de ovócitos que expulsaram o corpúsculo polar após o cultivo *in vitro*;
- 4) Determinar a concentração final dos hormônios esteróides 17 beta-estradiol e progesterona no meio de cultivo após maturação *in vitro* dos CCOs, bem como o cálculo da razão 17 beta-estradiol / progesterona;
- 5) Determinar, em células do *cumulus* isoladas dos CCOs cultivados, a expressão gênica de proteínas relacionados à:
  - (a) Esteroidogênese das células do cumulus,
  - (b) Nutrição do CCO,
  - (c) E viabilidade celular (apoptose e sobrevivência celular).

#### 4. MÉTODOS

Ovários de vacas pré-púberes e adultas *Bos taurus* foram obtidos em matadouros da região periférica do Distrito Federal (Planaltina e Luziânia) e transportados ao laboratório em solução fisiológica (0,9% NaCl) aquecida a aproximadamente 35 – 37°C (SIRARD & BILODEAU, 1990). Todas as coletas foram realizadas entre os períodos de dezembro e maio.

Os ovários trazidos ao laboratório eram pressionados e lavados em nova solução fisiológica aquecida para a retirada do excesso de sangue dos tecidos. Logo a seguir eram colocados em béquer, contendo solução fisiológica (0,9% NaCl), localizado dentro do banho-maria, com temperatura estabilizada a 36 – 37°C.

Os folículos antrais foram aspirados utilizando agulhas 21G (25 mm X 0,8 mm) e seringas descartáveis e o fluido coletado foi colocado em tubos falcon de 15 mL que estavam parcialmente submersos no banho-maria, cuja água estava entre 36 e 37°C. Os CCOs foram aspirados de folículos entre 2 e 8 mm de diâmetro, com aparência e fluido translúcido e vascularização aparente, indicando tratar-se de folículos saudáveis. Ovários contendo ou não corpo lúteo foram utilizados para o procedimento de aspiração folicular dos CCOs.

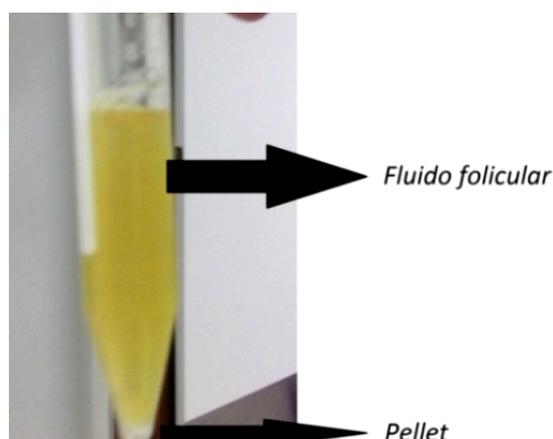
O fluido folicular contido no tubo falcon foi deixado por 15 minutos no banho-maria para decantar os CCOs (Figura 3). Em seguida, o pellet contendo os CCOs foi retirado com a ajuda de uma pipeta Pasteur estéril. Os CCOs foram ressuspensos em placas de petri contendo uma mistura de fluido folicular (Figura 3) e solução PBS/BSA, composta de tampão fosfato 10X (PBS) (GIBCO) diluído em água milliQ (1:9); 0,003% de albumina sérica bovina (BSA) fração V (Sigma); 0,022 µg/mL de piruvato de sódio (Sigma); e 50 UI/mL de penicilina (Sigma) e estreptomicina (Sigma) para a seleção dos CCOs. Antes de ser utilizada a solução PBS/BSA era esterilizada em filtros estéreis e descartáveis contendo membrana específica para filtração (Millex®, 33 mm, Millipore).

Todo o procedimento de seleção de ovócitos foi realizado dentro de fluxo laminar esterilizado previamente (limpeza com álcool 70% e radiação UV por 15 minutos) e utilizando o microscópio estereoscópio com apoio de uma placa aquecedora, mantendo a temperatura entre 36,5 e 37°C de todas as soluções utilizadas.

Os CCOs foram lavados uma vez em gotas de 200 a 300 µL da solução PBS/BSA e lavados três vezes no meio de cultivo no qual seria posteriormente

alocado, para a retirada completa de resíduos de tecidos e células foliculares que poderiam influenciar o cultivo dos CCOs. Os CCOs eram então transferidos para placas de quatro poços que continham os respectivos meios de tratamento.

Entre 35 a 40 CCOs foram cultivados conjuntamente por 22 a 25 horas em 400  $\mu$ L de um dos meios de maturação, pré-incubados por no mínimo 2 horas em estufa, com ambiente controlado em 95% de umidade (umidade saturada), 5% de CO<sub>2</sub> e a 38,5°C, para equilibrar o pH dos meios de cultivo. O tempo de cultivo entre 22 e 25 horas foi estabelecido com base em experimentos piloto que demonstraram que os ovócitos adquiriram aspecto escurecido e as células do *cumulus* passavam a se desprender facilmente, denotando degeneração, após mais de 24 a 25 horas de cultura (dados observados experimentalmente e não mostrados).



**Figura 3: Tubo falcon contendo fluido folicular e pellet contendo os CCOs aspirados de folículos entre 2 e 8 mm.**

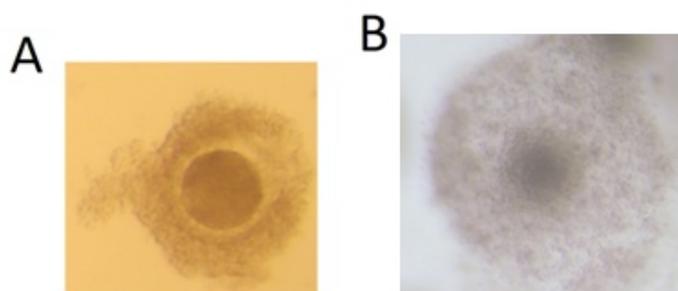
Na figura observa-se o pellet formado pela decantação de CCOs e restos de células foliculares provenientes da aspiração de folículos ovarianos. O fluido folicular é parcialmente usado para a ressuspensão do pellet, juntamente com a solução tampão PBS/BSA, para a seleção morfológica dos CCOs viáveis para MIV.

#### **4.1 Seleção morfológica dos CCOs viáveis para cultura**

A seleção morfológica dos CCOs foi feita em microscópio estereoscópio e apenas os classificados em grau I (Figura 4) e II foram selecionados para o cultivo. A classificação morfológica segue os critérios a seguir (VIANA *et al.*, 2004):

- Grau I = células do *cumulus* compacto, contendo no mínimo três camadas de células e ovócito com citoplasma homogêneo;

- Grau II = células do *cumulus* compacto, com menos de três camadas de células do *cumulus* e citoplasma ovocitário levemente heterogêneo;
- Parcialmente desnudo: remoção completa das células do *cumulus* em, pelo menos, 1/3 de sua superfície;
- E completamente desnudo, degenerado ou completamente expandido.



**Figura 4: Complexo *cumulus* ovócito (CCO) imaturo (A) e grau I (B).**

Na figura observa-se o ovócito (esfera mais escura ao centro), zona pelúcida (halo claro em volta do ovócito) e várias camadas de células do *cumulus* circundando a zona pelúcida. **A.** Ovócito imaturo, onde se observa não haver expansão das células do *cumulus*. **B.** A presença das células do *cumulus* torna a visualização do ovócito desfocada, porém observa-se que se trata de um CCO grau I, pois possui várias camadas íntegras. A foto foi tirada após cultivo em meio MIV B na presença de 10 ng/mL de FSH, por isso as células do *cumulus* encontram-se totalmente expandidas.

#### 4.2 Meios de cultura de maturação *in vitro* (MIV) de CCOs

O meio definido MIV B é composto de um meio diluente Alpha-MEM (GIBCO) suplementado com hepes (Sigma), bicarbonato (Sigma), álcool polivinílico (PVA) (Sigma), transferrina (GIBCO), aminoácidos não essenciais (Sigma), androstenediona (Sigma), e 50 UI/mL de penicilina (Sigma) e estreptomicina (Sigma). Antes de ser utilizado, o meio era esterilizado por filtração em filtros estéreis e descartáveis contendo membrana específica (Millex®, 33 mm, Millipore).

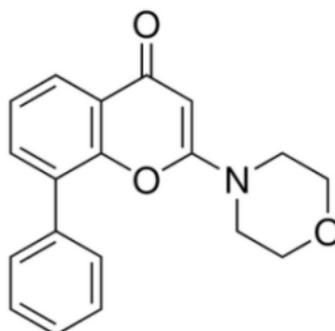
O meio foi suplementado ou não com 10 ng/mL de FSH (Sigma) e/ou com concentrações de 10 ou 100  $\mu$ M do inibidor LY294002 (Sigma). Após a preparação, os meios permaneciam em estufa de CO<sub>2</sub> por 2 horas, no mínimo, para estabilização do pH. Os meios de maturação eram coletados antes e após o cultivo para posterior dosagem de hormônios esteróides.

Todos os itens do meio foram mantidos ao longo do experimento, logo um único lote, para cada item, foi utilizado durante todos os experimentos.

O meio MIV B de maturação de ovócitos é patente do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução, por isso sua fórmula completa não pode ser divulgada, porém encontra-se disponível para parceria científica.

#### 4.3 Diluição da molécula LY294002, o inibidor da proteína PI3-K

O LY294002 hidrocloreto [2-(4-morfolinil)-8-fenil-1(4H)-benzopirran-4-one hidrocloreto] (Figura 5) foi diluído em solução de 5 mg/dL de dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma) e água milliq. As concentrações finais utilizadas nos meios de cultura foram 0, 10 ou 100  $\mu$ M, pois Hoshino e colaboradores (2004) observaram efeito dessas doses do inibidor sobre a maturação nuclear de ovócitos.



**Figura 5: Fórmula química do inibidor da proteína PI 3-K, a molécula LY294002.**

Fórmula química do LY294002 hidrocloreto [2-(4-morfolinil)-8-fenil-1(4H)-benzopirran-4-one hidrocloreto]. Retirado do site da Sigma-Aldrich <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/I9908?lang=pt&region=BR>.

#### 4.4 Avaliação da expansão das células do *cumulus* dos CCOs após o cultivo

O aspecto de expansão das células do *cumulus* também foi observado e analisado em todos os experimentos de MIV. A expansão das células será descrita como: sem expansão (–), com leve expansão (+) e expansão completa (++) das células do *cumulus*, segundo descrito previamente por Sirard (1990).

A expansão do *cumulus* não foi avaliada estatisticamente, apenas morfológicamente.

#### 4.5 Avaliação da taxa de maturação nuclear dos ovócitos após a MIV

Após o cultivo, os CCOs foram retirados dos respectivos tratamentos, lavados uma vez na solução PBS/BSA estéril e desnudados mecanicamente por pipetagens sucessivas, até o desprendimento total das células do *cumulus* (RICHARD & SIRARD, 1996). Após o desnudamento, os ovócitos isolados de cada tratamento foram fixados em 1,5 mL de solução de etanol: ácido acético glacial (3:1) (Dinâmica) por, no mínimo, 48 horas.

Após esse período, os ovócitos mantidos na solução de etanol: ácido acético glacial (3:1) foram pipetados sobre a lâmina e, em seguida, foi colocada a lamínula. A lamínula foi fixada utilizando parafina diluída em vaselina. A seguir, foi adicionado o corante lacmóide (Sigma) diluído a 1% utilizando solução de 44% de ácido acético glacial. Após a verificação da coloração do ovócito, a lamínula, já fixada, foi completamente vedada para evitar evaporação das soluções até o momento da avaliação do estágio da meiose (SIRARD, 1990; OLIVEIRA E SILVA, 2008; OLIVEIRA E SILVA *et al.*, 2011).

A avaliação do estágio de maturação ovocitária foi feita utilizando microscópio de contraste de fase utilizando os aumentos de 400x e 1000x (SIRARD, 1990; OLIVEIRA E SILVA, 2008; OLIVEIRA E SILVA *et al.*, 2011) e de acordo com as características nucleares de cada fase da meiose (Tabela 1 e Figura 6). Dois observadores treinados fizeram as análises.

O número de ovócitos analisados por grupo foi: 0FSH 0LY (n=51); 0FSH 10LY (n=51); 0FSH 100LY (n=42); 10FSH 0LY (n=44); 10FSH 10LY (n=32); 10FSH 100LY (n=73), totalizando 293 ovócitos provenientes de três experimentos de MIV diferentes.

**Tabela 1: Características que permitem a classificação dos ovócitos segundo o seu estágio de maturação nuclear.**

Fase da meiose	Característica da fase da meiose
Prófase I (VG/ VGBG)	Fase mais longa da meiose. Dividida em leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese. O ovócito inicia a meiose na fase de diplóteno, pois esta é inibida desde o período embrionário.

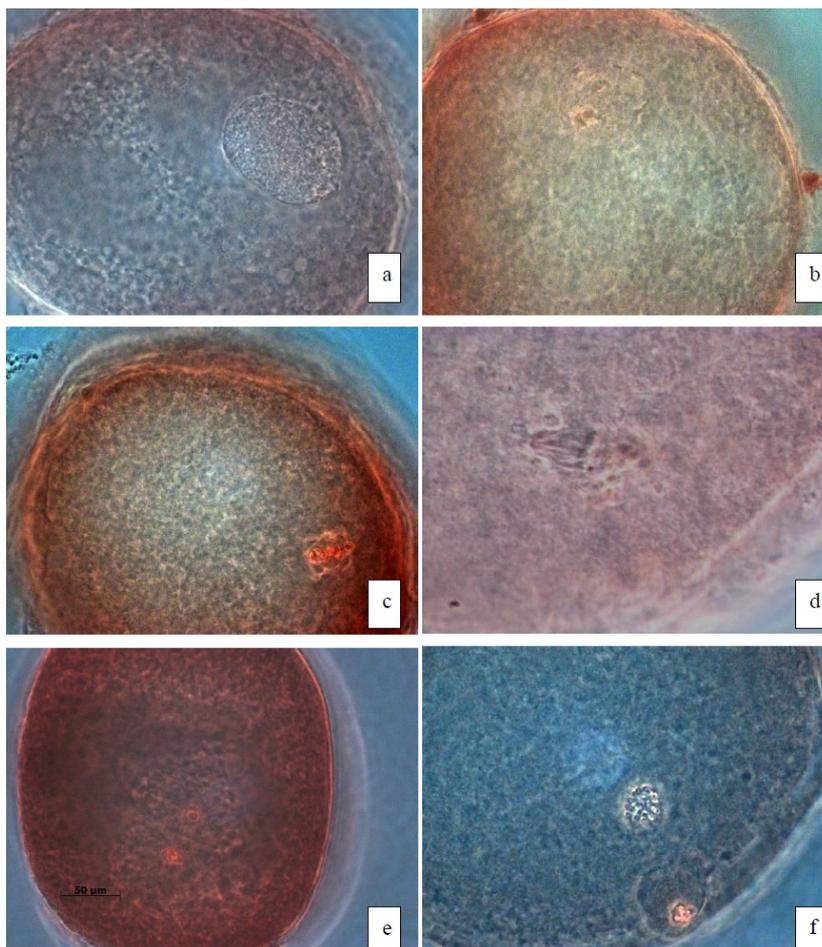
	<p>-Diplóteno (ou dictióteno): já houve duplicação do material genético e <i>crossing over</i>. Os cromossomos estão mais condensados e visíveis e ainda estão ligados entre si através dos quiasmas, mas já inicia-se a separação dos cromossomos homólogos.</p> <p><b>Características observadas<sup>1</sup>: grande núcleo central e envoltório nuclear visível.</b></p> <p>-Diacinese: separação dos cromossomos homólogos; ruptura do envelope nuclear e migração dos cromossomos para a placa (local) onde ocorrerá a metáfase I.</p> <p><b>Características observadas<sup>1</sup>: núcleo migra para região próxima à membrana do ovócito e há desaparecimento do envoltório nuclear. Há possibilidade de visualização dos cromossomos.</b></p>
Metáfase I	<p>Cromossomos duplos, máxima condensação cromossômica e presença de quiasmas.</p> <p>Nucléolo e envoltório nuclear não estão presentes.</p> <p>Microtúbulos, partindo dos centríolos, se tornam evidentes formando o fuso meiótico.</p> <p><b>Características observadas<sup>1</sup>: cromossomos muito condensados e placa metafásica aparente.</b></p>
Anáfase I	<p>Microtúbulos aparentes.</p> <p>Divisão dos cromossomos homólogos. Inicia-se a migração das cromátides-irmãs para onde serão os respectivos núcleos.</p> <p><b>Características observadas<sup>1</sup>: microtúbulos aparentes e cromossomos migrando para as extremidades.</b></p>
Telófase I	<p>Desaparecimento dos microtúbulos aparentes.</p> <p>Cromossomos descondensam e tem-se o início da reorganização dos núcleos recém formados.</p> <p><b>Características observadas<sup>1</sup>: Dois grupos de núcleos separados, porém sem divisão da membrana citoplasmática.</b></p>
Prófase II *	<p>Fase muito rápida e não visualizável.</p> <p>Cromossomos reiniciam a condensação, forma-se 2 fusos e há quebra do envoltório nuclear novamente.</p>
Metáfase II	<p>Cromossomos com 2 cromátides-irmãs.</p> <p>1º Corpúsculo polar presente ou ausente.</p> <p><b>Características observadas<sup>1</sup>: 1º Corpúsculo polar pode estar visível na lâmina ou não. Cromossomos condensados e menores</b></p>

	<b>comparativamente à metáfase I. Placa metafásica aparente.</b>
--	--

VG (vesícula germinativa); VGBD (quebra da vesícula germinativa).

<sup>1</sup>Características observadas nos ovócitos analisados e que permitiram a classificação do estágio de maturidade nuclear (fase da meiose). Modificado de JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1997 e RECCO-PIMENTEL e AGUIAR JÚNIOR, 2007.

\*Fase não analisada nos resultados.



**Figura 6: Estágios da maturação nuclear de ovócitos bovinos corados com orceína.**

(a) Vesícula Germinativa, (b) Quebra de Vesícula Germinativa, (c) Metáfase I, (d) Anáfase I, (e) Telófase I e (f) Metáfase 2.

#### **4.6 Dosagem de hormônios esteróides após cultivo dos CCOs *in vitro***

Os meios de maturação de ovócitos foram coletados após o cultivo *in vitro* e congelados em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ . Os hormônios esteróides 17 beta-estradiol e progesterona foram dosados pelo método de quimioluminescência por meio de uma

parceria científica para fins de pesquisa entre o Laboratório de Biotecnologia da Reprodução da UnB e o laboratório Sabin©.

A razão 17 beta-estradiol/ progesterona (razão E2/P4) também foi calculada dividindo-se os valores obtidos de estradiol e progesterona para cada amostra.

Os valores de 17 beta-estradiol e progesterona são expressos em ng/mL. Foram utilizadas de 3 a 10 replicatas biológicas para as dosagens em cada meio.

#### **4.7 Isolamento e armazenamento das células do *cumulus* para PCR *real time***

Os ovócitos foram desnudados mecanicamente em tampão PBS/BSA estéril por sucessivas pipetagens até o desprendimento completo das células do *cumulus*. As células do *cumulus* isoladas foram transferidas para um tubo eppendorf de 1,5 mL e centrifugada 1 vez por 5 minutos a 6.000 rpm para decantação das células e retirada do tampão PBS/BSA. Em seguida, era adicionado tampão PBS puro, as células eram ressuspensas e mais uma vez centrifugadas por 5 minutos a 6.000 rpm para decantação das células isoladas.

O sobrenadante foi retirado e o pellet foi congelado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  na presença de 50 ou 100  $\mu\text{L}$  Trizol Plus (Ambion, Life Technology) até o momento da extração do RNA total. Todas as análises de expressão gênica foram feitas pela técnica de PCR *real time*.

#### **4.8 Isolamento do transcrito (RNA) total**

Todo o procedimento foi realizado em locais cuja bancada era previamente esterilizada com água destilada e álcool 70% e tratada com a solução para eliminação de RNases RNase Zap (Applied Biosystem). Após o procedimento de limpeza, as células do *cumulus* foram utilizadas para extração do RNA total e síntese de cDNA para verificação da expressão gênica dos genes de interesse.

O isolamento do RNA total seguiu o protocolo do Trizol Plus, com as seguintes alterações:

1. Iniciava-se com a homogeneização da amostra em 300 $\mu\text{L}$  de Trizol Plus;
2. Adicionou-se 60  $\mu\text{L}$  de clorofórmio (VETEC) e homogeneizou-se a amostra vigorosamente;
3. Após 3 minutos de incubação em temperatura ambiente, centrifugou-se a 12.000 xg por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ ;

4. A fase aquosa (superior) foi retirada com pipeta automática, pois continha o RNA total. Houve o cuidado de evitar contaminação com a fase orgânica do centrifugado;
5. Logo a seguir, pipetava-se o RNA total em 150  $\mu$ L de isopropanol (VETEC) e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos;
6. Centrifugava-se novamente por 12.000 xg por 10 minutos a 4°C;
7. Todo o sobrenadante foi retirado e adicionou-se 300  $\mu$ L de etanol 75% (VETEC) ao pellet formado;
8. Centrifugava-se por 7.500 xg por 5 minutos a 4°C;
9. O sobrenadante era descartado e o pellet continha o RNA total isolado. Os tubos eppendorf eram deixados em fluxo laminar para evaporação completa do etanol;
10. O RNA total foi ressuspense em água destilada ultra pura, livre de RNase, DNase e pirogênio (Invitrogen), para posterior mensuração da concentração e qualidade do RNA.

A concentração e a qualidade do RNA eram verificadas utilizando 2  $\mu$ L do RNA ressuspense de cada amostra por meio do aparelho NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific). O RNA utilizado para a síntese de cDNA deveria ter valor de absorbância  $A_{260}/A_{280}$  entre 1,8 e 2,0, indicando a qualidade da amostra. Se a amostra não alcançasse esse valor, seria descartada.

Três amostras de RNA total também foram utilizadas para a análise no aparelho 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies©) onde foi identificada a qualidade da amostra. O número de integridade do RNA (RIN) das amostras estava entre 6,80 e 7,10, portanto, caracterizadas como amostras de alta qualidade.

Os tubos contendo RNA foram estocados em freezer -80°C até o momento da síntese de cDNA.

#### **4.9 Síntese do DNA complementar (cDNA)**

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit *QuantiTect® Reverse Transcription* (Qiagen) em tubos de 0,2 mL. Todos os passos indicados pelo fabricante foram seguidos.

O protocolo consistia em duas fases: inicialmente calculava-se o volume necessário da amostra de RNA previamente isolada para alcançar o valor de 2  $\mu$ g de RNA total a cada 40  $\mu$ L de reação de síntese de cDNA. Em seguida, adicionava-se

ao tubo *gDNA wipeout buffer*, que contém enzima para eliminação de qualquer contaminação por DNA genômico. Logo após, incubava-se o tubo em termociclador por 2 minutos a 42°C.

A segunda fase consistia, seguindo as proporções propostas pelo fabricante, em adicionar:

1. *Quanti Reverse Transcriptase* que contém enzimas com alta afinidade para o RNA e melhora a síntese de cDNA, além de inibidores de RNAses;
2. *Quantiscript RT buffer* que contém  $Mg^{2+}$  e dNTPs;
3. E *RT primer mix* que é uma mistura de oligoDT e *primers* randômicos.

Logo em seguida, a reação englobava 30 minutos a 42°C e 3 minutos a 95°C. O último ciclo inibe a *Quanti Reverse transcriptase*. Após a finalização de todas as etapas o tubo contendo cDNA era colocado no gelo e, em seguida, estocado em freezer -20°C até o momento da avaliação de expressão gênica por PCR *real time*.

#### **4.10 Padronização das condições de PCR *real time* (qPCR) para detecção dos genes de interesse**

Os genes contidos na Tabela 2 foram testados para avaliação da expressão gênica de células do *cumulus* pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR *real time* ou qPCR). A partir das primeiras fitas de cDNA o gene de interesse é amplificado pela presença de um sistema enzimático específico e pela presença de *primers* específicos para a sequência do gene (KUBISTA *et al.*, 2006).

Os *primers* para cada gene de interesse foram desenhados baseados nos códigos do *GenBank* (Tabela 2) utilizando o site da empresa Integrated DNA Technologies®. A ferramenta IDTSciTools® checa as características de cada sequência para determinar se satisfaziam as necessidades técnicas do PCR *real time*, como a geração de dímeros de *primer* ou a formação de estruturas secundárias que os impediriam proporcionar a amplificação da sequência de cDNA de interesse. Todos os *primers* obtiveram 100% de homologia com as referidas sequências genômicas de *Bos taurus*.

Após o desenho dos *primers*, foram feitos diversos testes para validar os *primers*, utilizando concentrações diferentes de *primers* e cDNA. Os *primers* foram testados na presença do cDNA de amostras de células do *cumulus* para verificação das temperaturas de *melting*, múltiplos picos na curva de *melting*, contaminações e

outros possíveis erros. Após a padronização das condições ideais de trabalho, as análises dos experimentos foram realizadas para geração dos resultados finais.

Para o PCR *real time* trabalhou-se com mixes de componentes para diminuir o erro de pipetagem. Portanto, trabalhou-se com um cDNA mix e um *primer* mix. No cDNA mix eram colocados o cDNA (50 a 100ng/ $\mu$ L de cDNA por poço de reação), água destilada ultra pura livre de RNase, DNase e pirogênio e o *SybrGreen Fast* (Applied Biosystem). Já o *primer* mix correspondia a mistura do *primers Forward* e *Reverse* diluídos em água, sendo que a concentração final de *primer* para o PCR *real time* era de 100 nM de *Forward* e 100 nM de *Reverse* por poço. Todo esse procedimento era feito em fluxo laminar previamente esterilizado com UV e RNase Zap.

As reações de PCR foram preparadas em placas de 96 poços (Applied Biosystem) com volume de reação de cada poço igual a 20  $\mu$ L, sendo esse composto por 18,4  $\mu$ L de cDNA mix e 1,6  $\mu$ L de *primer* mix. As reações de PCR foram feitas utilizando quadruplicatas idênticas, ou seja, em um poço da placa de PCR era pipetado o volume total das replicatas e, em seguida, 20  $\mu$ L eram distribuídos nos demais outros poços, diminuindo os erros de pipetagem, e constituindo as replicatas idênticas. A preparação da placa de 96 poços de PCR era feita em fluxo laminar previamente esterilizado com UV e RNase Zap e, em seguida, centrifugada para ser levada à máquina de PCR.

Os ciclos de PCR foram 95°C por 20 segundos, para ativação da enzima; 95°C por 3 segundos, para desnaturação; e 60°C por 30 segundos para anelamento e extensão do cDNA (*Sybr Green Fast*; Applied Biosystem).

O PCR *real time* foi feito em sistema *Step One Plus* (Applied Biosystem) e o acúmulo dos produtos da amplificação do DNA de interesse foi mensurado pelo aumento da fluorescência de *SybrGreen Fast* (Applied Biosystem) a cada ciclo. Os dados foram analisados no *Software* do *Step One Plus* (Applied Biosystem).

Para cálculo da quantificação relativa de expressão gênica de cada gene foi utilizado o método  $\Delta\Delta$ CT. Todos os valores de expressão foram padronizados pelo gene controle ciclofilina A (CYC) e o grupo VG foi utilizado como calibrador. A ciclofilina foi escolhida como gene de referencia, pois teve valores de expressão gênica muito próximos entre os grupos experimentais.

Para os experimentos de expressão gênica foram utilizadas duplicata a quaduplicata biológicas, ou seja, duas a quatro amostras (pool de células do *cumulus* isoladas) de experimentos de MIV diferentes foram analisadas por qPCR.

**Tabela 2: Desenhos dos *primers* e o código *GenBank* para cada transcrito da espécie *Bos taurus*.**

<b>Gene</b>	<b>Sequência dos <i>primers</i></b>	<b>Código do <i>GenBank</i> ou referência</b>
<b>Controle interno (genes de referência)</b>		
<i>CYC</i>	F: TGGCAAGTCCATCTATGGCGAGAA R: ATCCAACCACTCAGTCTTGGCAGT	NM_178320
<b>Esteroidogênese</b>		
<i>FSHR</i>	F: AGAAGAAAGCAGGTGGATGG R: GTTAGAGCAGTGACAGAGTCG	NM_174061
<i>LHR</i>	F: TGAAAGCACAGCAAGGAGAC R: GGAGTGTCTTGGGTAAGCAG	U20504
<i>CYP11A1</i>	F: GCTCCAGAGGCAATAAAGAAC R: GATGTCCCCTACAACTTTCCG	NM_176644
<i>CYP19A1</i>	F: CTTGGGCTATGTGGACGTG R: CCCCTGGATGTTAACCACG	U18447
<i>HSD17B1</i>	F: CCGTCCCAGAGCTTCAAAG R: GAATCTGCATCCCTCACGTC	NM_001102365
<b>Metabolismo intermediário</b>		
<i>GLUT1</i>	F: CCAAGGATCTCTCAGAGCACAG R: TTCTTCTGGACATCACTGCTGG	Sagirkaya <i>et al.</i> , 2007
<i>GLUT4</i>	F: CTCCCTGCAGTTTGGCTAC R: CCACGTCTGGTTGTAGAACTC	NM_174604
<i>PDH</i>	F: TGTTTCCTGAACCTGGAAGCTCCT R: AGCACTTCCACTTGTCTGGGATGT	NM_174507
<i>G6PDH</i>	F: AGGCCGTGTACACCAAGATGATGA R: ATCGGTTGCCATAGGTCAGGTCAA	NM_001244135
<b>Apoptose celular</b>		
<i>BAX</i>	F: GTTGTGCGCCCTTTTCTACTTTG R: AAGGAAGTCCAATGTCCAGC	NM_173894

<i>BCL-2</i>	F: CCCTGT TTGATTTCTCCTGGCTGT R: TGGGCTTCACTTATGGCCCAG ATA	NM_001166486
<b>Exocitose</b>		
<i>SNAP25</i>	F: TTGATACACAGAACCGCCAG R: TTTAACCACTCCCCAGCATC	NM_001076246

GLUT1: transportador facilitado de glicose 1; GLUT4: transportador facilitado de glicose 4; PDH: piruvato desidrogenase; G6PDH: glicose 6-fosfato desidrogenase; *FSHR*: receptor de FSH; LHR: receptor de LH; *CYP11A1*: enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol A1; *CYP19A1*: aromatase; HSD17B1: hidroxiesteroide desidrogenase 17 beta 1; SNAP25: proteína associada a sinaptossoma 25; BAX: proteína X associada à família Bcl-2; BCL-2: *B-cell CLL/lymphoma-2*; CYC: ciclofilina A.

#### 4.11 Grupos experimentais utilizados no cultivo dos CCOs *in vitro*

Os grupos experimentais correspondem aos meios de maturação de CCOs *in vitro* utilizados no presente trabalho, e a nomenclatura utilizada nos resultados é apresentada entre parênteses, a seguir:

- 1) MIV B, sem FSH, sem LY294002 (0FSH 0LY ou 0FSH);
- 2) MIV B, sem FSH + 10 µM do inibidor LY294002 (0FSH 10LY);
- 3) MIV B, sem FSH + 100 µM do LY294002 (0FSH 100LY);
- 4) MIV B + 10 ng de FSH/mL, sem LY294002 (10FSH 0LY ou 10FSH);
- 5) MIV B + 10 ng de FSH/mL + 10 µM do LY294002 (10FSH 10LY);
- 6) MIV B + 10 ng de FSH/mL + 100 µM do LY294002 (10FSH 100LY).

Em alguns experimentos também foram utilizados CCOs imaturos (antes do cultivo) ou também denominados de vesícula germinativa (VG), bem como os cultivados em meio contendo soro e 200 ng/mL de FSH (TCM-199), a título de comparação. Esses grupos serão mencionados posteriormente, quando necessário.

#### 4.12 Delineamento experimental

Os CCOs cultivados nos meios-teste de MIV, anteriormente descritos, foram utilizados para as seguintes aferições experimentais:

- 1) Avaliação da expansão das células do *cumulus* dos CCOs após o cultivo em cada um dos meios;
- 2) Após o cultivo, os CCOs foram desnudados e os ovócitos isolados (Figura 7) para determinação do estágio da meiose em que se encontravam e os meios

eram coletados para dosagem dos hormônios esteróides 17 beta-estradiol e progesterona. O cálculo da razão 17 beta-estradiol e progesterona (E2/P4), para verificação do perfil esteroidogênico das células do *cumulus* isolados dos CCOs cultivados *in vitro*, era feito para cada amostra.

Após esses experimentos iniciais, optou-se por trabalhar apenas com a dose de 100  $\mu\text{M}$  de LY294002, excluindo-se a dose de 10  $\mu\text{M}$  por não apresentar significância estatística nas mensurações realizadas.

A seguir, foram feitos os seguintes experimentos:

3) Após o cultivo, os ovócitos desnudos foram separados, em microscópio estereoscópio, de acordo com o grau de maturação, ou seja, a presença ou ausência de corpúsculo polar (Figura 8). No mínimo, quatro experimentos de MIV (quadruplicata biológica) foram feitos para determinação da taxa de expulsão do corpúsculo polar;

4) Correlacionou-se os valores de 17 beta-estradiol e progesterona com a expulsão do corpúsculo polar;

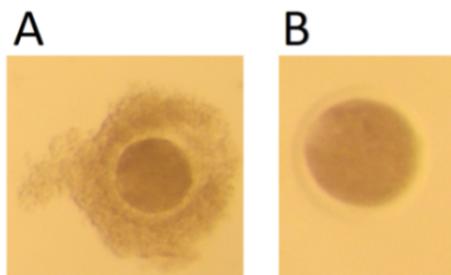
5) As células do *cumulus* também foram utilizadas para a verificação do perfil de transcrição gênica das enzimas da esteroidogênese. Nesse experimento células do *cumulus* de ovócitos antes do cultivo (ovócitos imaturos) foram coletados para servir de controle;

6) As células do *cumulus* isoladas foram utilizadas para avaliação da expressão gênica de enzimas relacionadas à nutrição do CCO e apoptose. Nesse experimento células do *cumulus* de ovócitos antes do cultivo (VG) foram coletados para servir de controle.

7) Com relação aos genes de apoptose celular, os valores obtidos para Bcl-2 e Bax foram utilizados para calcular a razão Bcl-2/Bax, o que corresponde a divisão das médias de expressão relativa de mRNA de Bcl-2 pela média de expressão Bax. Essa relação aponta a proporção de fatores pró-apoptóticos/ anti-apoptóticos nas células do *cumulus* isoladas dos CCOs cultivados.

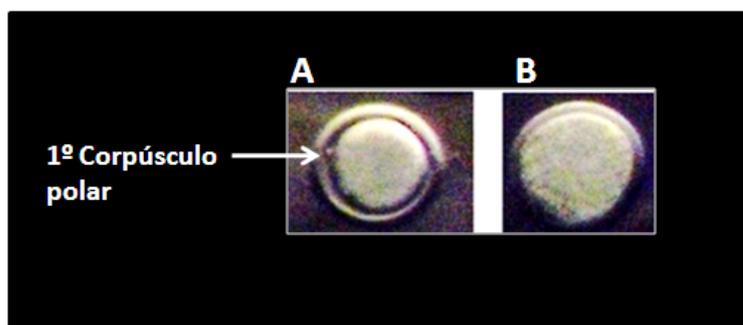
Deve-se salientar que diversos experimentos de MIV e de PCR *real time* foram feitos para padronização das condições ideais de PCR, o que não será demonstrado nos resultados.

Os resultados foram grupados em capítulos para facilitar o entendimento dos dados obtidos.



**Figura 7: Ovócitos antes e após o desnudamento (retirada total das células do *cumulus*).**

Na Figura **A** demonstra-se o ovócito (circunferência escura ao centro), zona pelúcida (halo claro em volta do ovócito) e células do *cumulus* aderidas à zona pelúcida. Na Figura **B** observa-se o desnudamento completo do ovócito, ou seja, retirada de todas as células do *cumulus*, restando apenas o ovócito e a zona pelúcida.



**Figura 8: Ovócitos desnudos evidenciando a presença (A) ou ausência (B) de corpúsculo polar.**

**A.** A presença do 1º corpúsculo polar, mostrado pela seta, evidencia o fim da primeira e o início da segunda meiose ovocitária, sendo um indicativo de maturidade nuclear (metáfase II) do ovócito. **B.** A ausência do corpúsculo evidencia a imaturidade nuclear ovocitária. Foto tirada em microscópio estereoscópio com contraste de fases.

#### 4.13 Análise estatística

Dados da maturação nuclear de três replicatas (3 experimentos de MIV diferentes) de cada grupo foram utilizadas para a análise estatística utilizando o teste qui ao quadrado (avaliação qualitativa). Foi aplicado o teste qui ao quadrado de partição entre as três concentrações do inibidor LY294002 dentro dos grupos 0FSH ou 10FSH para identificar os resultados significativamente diferentes, quando houvesse.

Para as dosagens de hormônios esteróides foi utilizado a ANOVA de duas vias para verificar a existência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos 0FSH e 10FSH e suas respectivas doses do inibidor. A seguir, foi aplicada a ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni, para comparação entre todos os grupos, 0FSH, 0FSH 10LY e 0FSH 100LY ou 10FSH, 10FSH 10LY e 10FSH 100LY, relativos a dosagens hormonais. O teste *t* de *Student* foi utilizado para comparar os grupos 0FSH e 10FSH em cada dose do inibidor LY294002.

A maturação nuclear, seguindo a classificação de presença ou ausência de corpúsculo polar, foi analisada utilizando ANOVA de duas vias para verificar a existência de diferença estatisticamente significativa entre os perfis dos grupos 0FSH e 10FSH e suas respectivas doses de inibidor. A ANOVA de uma via foi utilizada entre todos os grupos experimentais com corpúsculo ou sem corpúsculo. O teste *t* de *Student* foi aplicado para comparar com versus sem corpúsculo em cada meio-teste.

Para as análises de correlação linear entre dosagem hormonal e a porcentagem de expulsão do corpúsculo polar foi utilizada a regressão linear de Pearson, bem como calculado o  $R^2$  da correlação.

Para a análise de PCR real time foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Student-Newman-Keuls, pois o perfil das variáveis foi considerado não paramétrico pela avaliação estatística realizada.

O programa estatístico usado foi o BioEstat 5.0 e as diferenças encontradas foram consideradas significativas quando os valores de probabilidade fossem iguais ou menores do que 0,05.

#### **4.14 Aprovação pelo comitê de ética**

O projeto de pesquisa referente à presente tese de doutorado foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (número do protocolo 123248/2011).

#### **4.15 Conflito de interesses**

Os pesquisadores e alunos envolvidos no presente trabalho declaram que não há conflito de interesses com os temas expostos e avaliados na presente tese de doutorado.

## **CAPÍTULO I**

### **MATURAÇÃO NUCLEAR DO OVÓCITO E VIABILIDADE DAS CÉLULAS DO *CUMULUS***

**Ação da via PI3-K em meio definido patentado suplementado ou  
não com FSH**

## INTRODUÇÃO

A progressão da meiose é caracterizada pela quebra da vesícula germinativa, que corresponde à passagem do estágio estacionário em diplóteno da prófase I para dar continuidade à meiose, depende de uma série de proteínas intracelulares e leva à extrusão do primeiro corpúsculo polar. O ovócito progride até a metáfase II, porém apenas finalizará a segunda meiose se for fertilizado pelo espermatozóide, liberando o segundo corpúsculo polar (TRIPATHI *et al.*, 2010).

A imaturidade nuclear do ovócito, ou seja, o estado estacionário em diplóteno da prófase da primeira meiose, é mantido pelas elevadas concentrações de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e guanosina monofosfato cíclico (cGMP) que passam das células do *cumulus* para o ovócito através das junções comunicantes existentes entre esses tipos celulares, bem como das hipoxantinas e outros fatores liberados pelas células somáticas do folículo ovariano (TRIPATHI *et al.*, 2010; ORISAKA *et al.*, 2009). Há evidências de que o cAMP produzido pelo próprio ovócito também seja relevante no bloqueio da meiose (TRIPATHI *et al.*, 2010).

As altas concentrações intra-ovocitárias de cAMP mantém o estado estacionário da meiose, pois mantém o fator promotor de maturação (*maturation promoting factor* – MPF) inativo (TRIPATHI *et al.*, 2010). O MPF é composto por duas subunidades: a ciclina B, subunidade regulatória, e a cinase dependente de ciclina I (CDKI), que corresponde a subunidade catalítica (TATEMOTO e TERADA, 1996). A ativação do MPF envolve a desfosforilação da subunidade CDK1 e sua associação à ciclina B (TRIPATHI *et al.*, 2010).

O estado estacionário meiótico do ovócito é interrompido *in vivo* pelo pico de LH, que promove um aumento de cAMP e cGMP nas células foliculares levando à produção de fatores semelhantes ao fator de crescimento epidermal, como a amfiregulina e a epirugulina, que induzem a atividade da proteína cinase ativadora de mitógenos (*Mitogen-activated protein kinase* – MAPK). A MAPK promove a quebra da comunicação entre *cumulus* e ovócito que ocorre através das junções comunicantes. A ausência dessa comunicação, causa diminuição dos níveis de cAMP e cGMP e a leva à retomada da meiose (TRIPATHI *et al.*, 2010; SHIMADA, MAEDA e TERADA, 2001). Há evidências da importância da via PI3-K/MAPK sobre a regulação da maturação ovocitária por meio das junções comunicantes (SHIMADA, MAEDA e TERADA, 2001).

O ovócito permanece estacionado na meiose I até o fuso meiótico estar corretamente organizado. Há uma série de proteínas SAC (do inglês, *spindle assembly checkpoints*) envolvidas nesse processo. As proteínas SAC permitem o correto segregamento dos cromossomos homólogos. A ativação da proteína MAPK está relacionada à reorganização dos microtúbulos para o posicionamento do fuso metafásico próximo à membrana ovocitária (TRIPATHI *et al.*, 2010).

A remoção do ovócito do ambiente folicular interrompe a inibição da maturação nuclear causada pelas células somáticas do folículo podendo levar à finalização da meiose sem que o citoplasma tenha atingido a maturação adequada (BEVERS e IZADYAR, 2002). Assim, mesmo que o ovócito seja fertilizado, a assincronia entre a maturação nuclear e a citoplasmática pode ser um dos fatores responsáveis pela diminuição das taxas de PIVE. Os resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório indicam que a inibição da progressão da meiose causada pelos meios patenteados sugere um avanço importante da biotécnica de MIV, pois permite a progressão da maturação citoplasmática (GULART, 2009; OLIVEIRA e SILVA, 2008).

O cultivo de CCOs *in vitro* sob ação do FSH causa a finalização da meiose e expansão das células do *cumulus*, sendo que a presença de concentrações elevadas desse hormônio no meio de MIV aumenta significativamente as taxas de maturação nuclear (ROBERTS *et al.*, 2004). A PI3-K é uma das enzimas intracelulares ligadas à ação do FSH, da insulina e de fatores de crescimento, como o IGF-1, e participa da rota de inibição da enzima glicogênio sintase cinase-3 (GSK-3), outra proteína fundamental para a sinalização celular (ROBERTS *et al.*, 2004; NELSON & COX, 2005; SALTIEL & KAHN, 2001). Por exemplo, o IGF-1 tem ação reconhecida sobre a competência ovocitária, pois inibe a apoptose, aumenta a produção de androstenediona pelas células da teca e elevando a produção de estradiol pelos folículos ovarianos, atua na expansão do *cumulus* e melhora a maturação nuclear (VELAZQUEZ *et al.*, 2009).

A morte celular causada por apoptose envolve estímulo, sinalização celular, proteínas regulatórias e proteínas efetoras do processo (MORITA e TILLY, 1999). O primeiro passo é o estímulo, externo ou interno, seguido do recrutamento de proteínas de sinalização celular que interferem na ação das proteínas regulatórias, como as proteínas da família Bcl-2. As proteínas regulatórias são capazes de ativar

ou inativar as proteínas efetoras, como por exemplo, as caspases e nucleases (MORITA e TILLY, 1999).

A enzima GSK-3 tem capacidade fosforilativa e inúmeras funções, porém, inicialmente, foi descrita como molécula inibidora da enzima glicogênio sintase, assim estimulando a síntese de glicogênio (NELSON & COX, 2005). Porém, sua ação mais estudada e, provavelmente a mais importante, é na apoptose celular, sendo considerada, inclusive, o sensor intracelular fundamental da regulação desse evento. A GSK-3 é fortemente regulada, pois há convergência de várias cascatas de sinalização para a sua regulação, incluindo a PI3-K (BEUREL & JOPE, 2006).

A apoptose celular possui duas vias descritas: a via intrínseca e a extrínseca. A via intrínseca é a via intracelular, ou seja, é proveniente de sinais mitocondriais referentes a danos por estresse oxidativo, dano ao DNA, toxinas, hipóxia, estresse hipertônico, dentre outros estresses celulares. A via extrínseca é mediada por receptores de morte celular e por fatores hormonais que levam à célula à morte programada (BEUREL & JOPE, 2006).

A GSK-3 ativa a expressão de proteínas da família Bcl-2 (B cell lymphoma/leukaemia-2) que são pró-apoptóticas (Bax e Bim), além de inibir os que são anti-apoptóticos (Bcl-2 e MCL-1). Também inibe o fator de transcrição das proteínas de choque térmico (HSP), atua na desestabilização das proteínas do citoesqueleto, contribuindo para seus efeitos pró-apoptóticos e inibe a síntese proteica celular (BEUREL & JOPE, 2006).

As proteínas da família Bcl-2 são estudadas como marcadores de viabilidade ou inviabilidade ovocitária e embrionária. As duas mais estudadas são Bcl-2 e Bax. A proteína Bcl-2 localiza-se na membrana nuclear, mitocondrial e do retículo endoplasmático tendo efeito anti-apoptótico; e ao contrário, a proteína Bax é pró-apoptótico. Bcl-2 e Bax podem formar homodímeros e heterodímeros e uma das formas de Bcl-2 atuar de forma anti-apoptótica é justamente ligando-se ao Bax (BROWN, 1996).

Já sobre a via extrínseca, a GSK-3 possui efeitos inibidores, impedindo a cascata de sinalização mediada pelos receptores de morte celular e, por consequência, inibe a via das caspases responsáveis pela apoptose mediada por esses receptores (BEUREL & JOPE, 2006).

Esse efeito demonstra que a GSK-3 atua como facilitador (não como iniciador) da apoptose celular mediada por eventos intracelulares e extracelulares,

tornando-se assim um forte regulador do meio interno celular. Além disso, é inibido por fatores de crescimento, fortalecendo essa visão de sensor interno (NELSON & COX, 2005; BEUREL & JOPE, 2006). Além disso, em ovócitos imaturos localiza-se no núcleo e nos maduros localiza-se no citoplasma. Adicionalmente, a deficiência da expressão de GSK-3 causa inibição da divisão meiótica, impedindo a separação e segregação dos cromossomos homólogos (WANG *et al.*, 2003).

A sobrevivência celular e os genes Bax e Bcl-2 são potenciais marcadores de viabilidade celular dos CCOs *in vitro* e via PI3-K controla esse processo, pois trata-se de uma via que estimula a sobrevivência. Portanto, no presente capítulo visa-se estudar a ação da via PI3-K sobre a maturação nuclear e sobre os marcadores de viabilidade celular. Os testes foram feitos no meio definido patentado MIV B, com ou sem FSH, para estabelecer a importância da via sobre os parâmetros supracitados.

## RESULTADOS

A avaliação morfológica foi feita em todos os experimentos de MIV e o perfil encontra-se na Tabela 3, seguindo os critérios de Sirard (1990), e é apresentado visualmente na Figura 9.

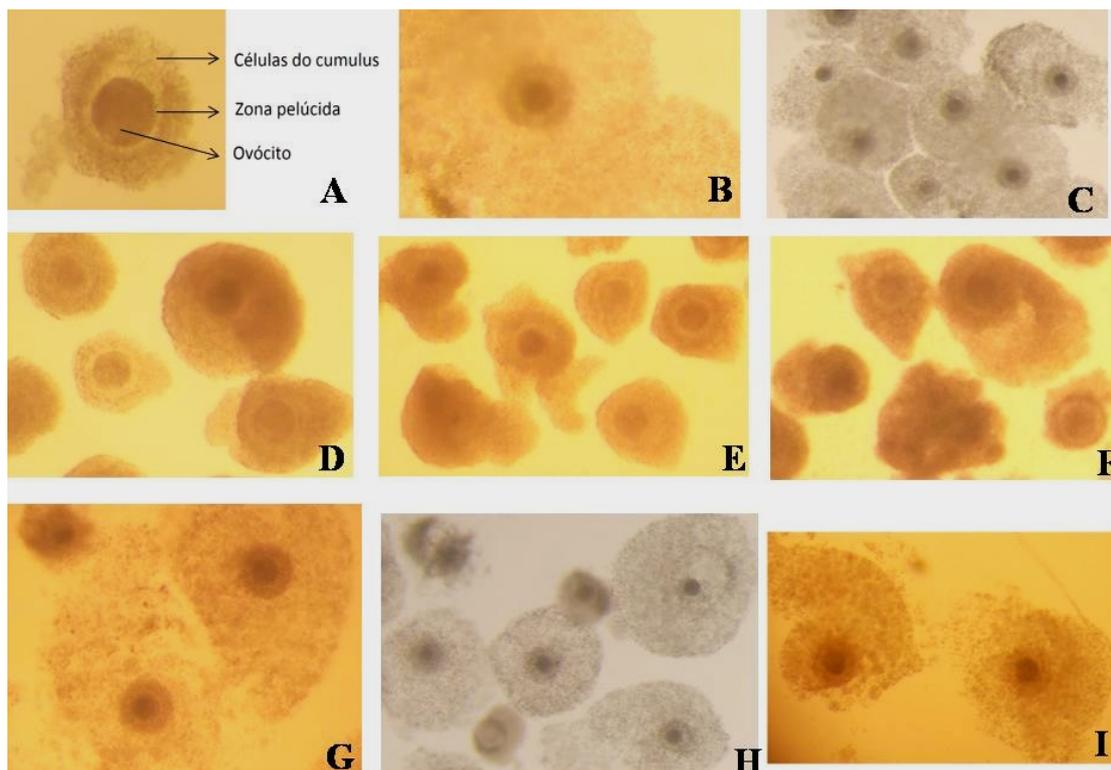
Na Figura 9 observa-se o perfil morfológico das células do *cumulus* em microscópio estereoscópio. A Figura 9A mostra o perfil de um CCO imaturo (antes do cultivo), que não apresenta expansão das células do *cumulus*. Já as Figuras 9B e C mostram o perfil de expansão das células do *cumulus* observadas no meio comercial, TCM-199 suplementado com soro e 200 ng/mL de FSH, nos quais se observa grande expansão.

O perfil mostrado pelos CCOs imaturos é semelhante aos CCOs cultivados no meio 0FSH 0LY (Figura 9D), 0FSH 10LY (Figura 9E) e 0FSH 100LY (Figura 9F).

O perfil dos CCOs cultivados nos meios 10FSH 0LY (Figura 9G), 10FSH 10LY (Figura 9H) e 10FSH 100LY (Figura 9I) mostra grande expansão do *cumulus*, comparando-se a expansão dos CCOs cultivados no meio comercial TCM-199.

A Tabela 3 mostra o perfil morfológico de expansão das células do *cumulus*. Nota-se que o meio MIV B sem FSH equipara-se ao ovócito imaturo, enquanto o meio contendo 10 ng/mL de FSH é semelhante ao meio contendo soro e altas doses de FSH, porém nenhum efeito do inibidor LY294002 é observado.

Vale ressaltar que o desnudamento mecânico dos CCOs cultivados no meio comercial era mais difícil do que o meio contendo apenas 10 ng/mL de FSH (dado não mostrado). Isso mostra diferenças na composição da matriz extracelular das células do *cumulus* entre os meios mencionados.



**Figura 9: Expansão das células do *cumulus* de CCOs antes do cultivo e após exposição a diferentes meios de MIV.**

As diferenças de tonalidade das figuras correspondem a diferenças de intensidade luminosa no momento da foto. Fotos tiradas em microscópio estereoscópio. Aumento de 2,5 no microscópio estereoscópio.

A. CCO imaturo (antes do cultivo): não mostra expansão das células do *cumulus*.

B. e C. CCOs cultivado em meio comercial (TCM-199) contendo soro fetal bovino e 200ng/mL de FSH demonstrando a expansão do *cumulus* de forma bastante pronunciada.

D. 0FSH 0LY;

E. 0FSH 10LY;

F. 0FSH 100LY;

G: 10FSH 0LY;

H: 10FSH 10LY;

I: 10FSH 100LY

**Tabela 3: Expansão das células do *cumulus* em cada grupo experimental testado comparado ao CCO imaturo e ao cultivado na presença de soro.**

<b>Tratamento</b>	<b>Expansão das células do <i>cumulus</i> dos CCOs</b>
Imaturo	-
TCM-199	++
0FSH 0LY	-
0FSH 10LY	-
0FSH 100LY	-
10FSH 0LY	++
10FSH 10LY	++
10FSH 100LY	++

TCM-199: suplementado com soro fetal bovino e 200 ng/mL de FSH.

Nota-se que a ausência da expansão das células do *cumulus* dos meios 0FSH, independente da presença do inibidor LY294002, comparam-se ao CCO imaturo. Já os meios contendo 10FSH comparam-se ao meio comercial (TCM-199 + soro + 200ng/mL FSH), independentemente da presença do inibidor.

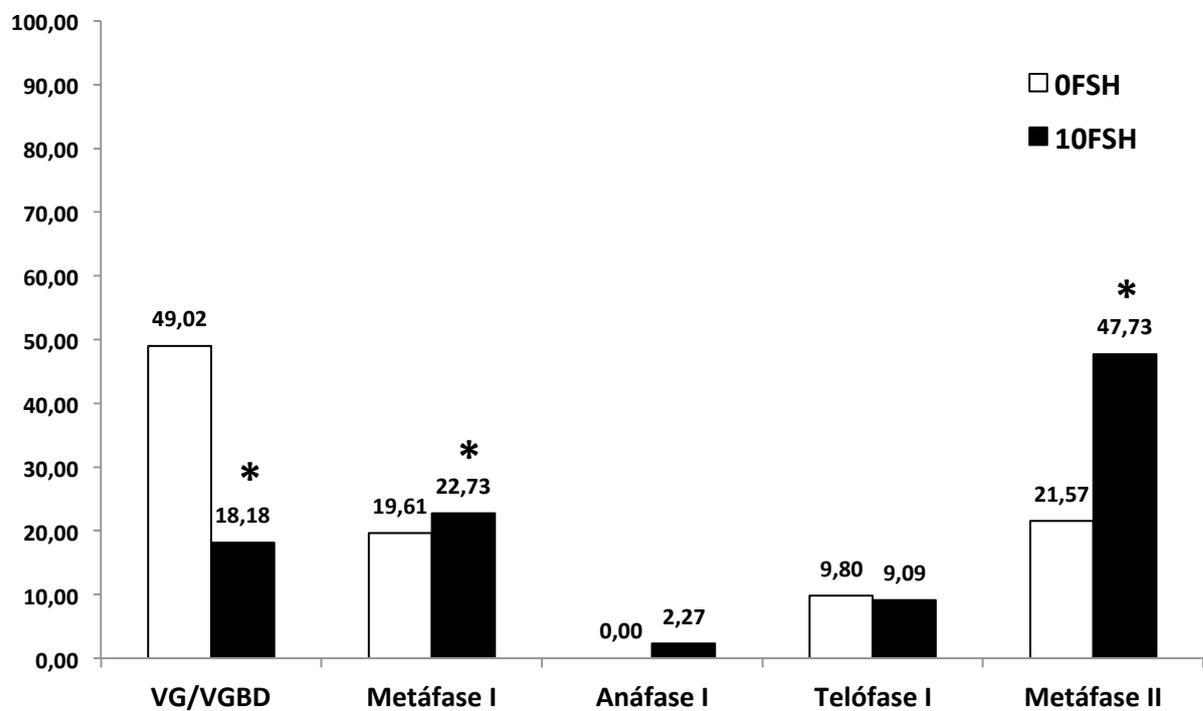
Os efeitos do MIV B, da adição de FSH e da interrelação com a via PI3-K sobre a retomada e progressão da meiose foram analisados utilizando a coloração por lacmóide e independentemente da presença do corpúsculo polar.

Na ausência de FSH observa-se maior porcentagem de ovócitos imaturos, ou seja, nas fases de VG/VGBD e metáfase I. A presença de 10 ng/mL de FSH no meio MIV B aumentou significativamente as taxas de ovócitos maduros (metáfase II) (Figura 10).

O efeito do inibidor LY294002 sobre a maturação nuclear foi feita utilizando as doses de 0, 10 e 100  $\mu$ M, para determinar a dose a ser utilizada nos experimentos subsequentes (Figura 11). Na ausência de FSH a dose de 100  $\mu$ M de LY294002

aumentou a porcentagem de ovócitos em metáfase I, anáfase I e metáfase II. Na presença de 10 ng/mL de FSH, a dose de 100  $\mu$ M de LY294002 elevou as taxas de anáfase I (Figura 11).

A dose de 10  $\mu$ M não teve efeito sobre a maturação nuclear (Figura 11).

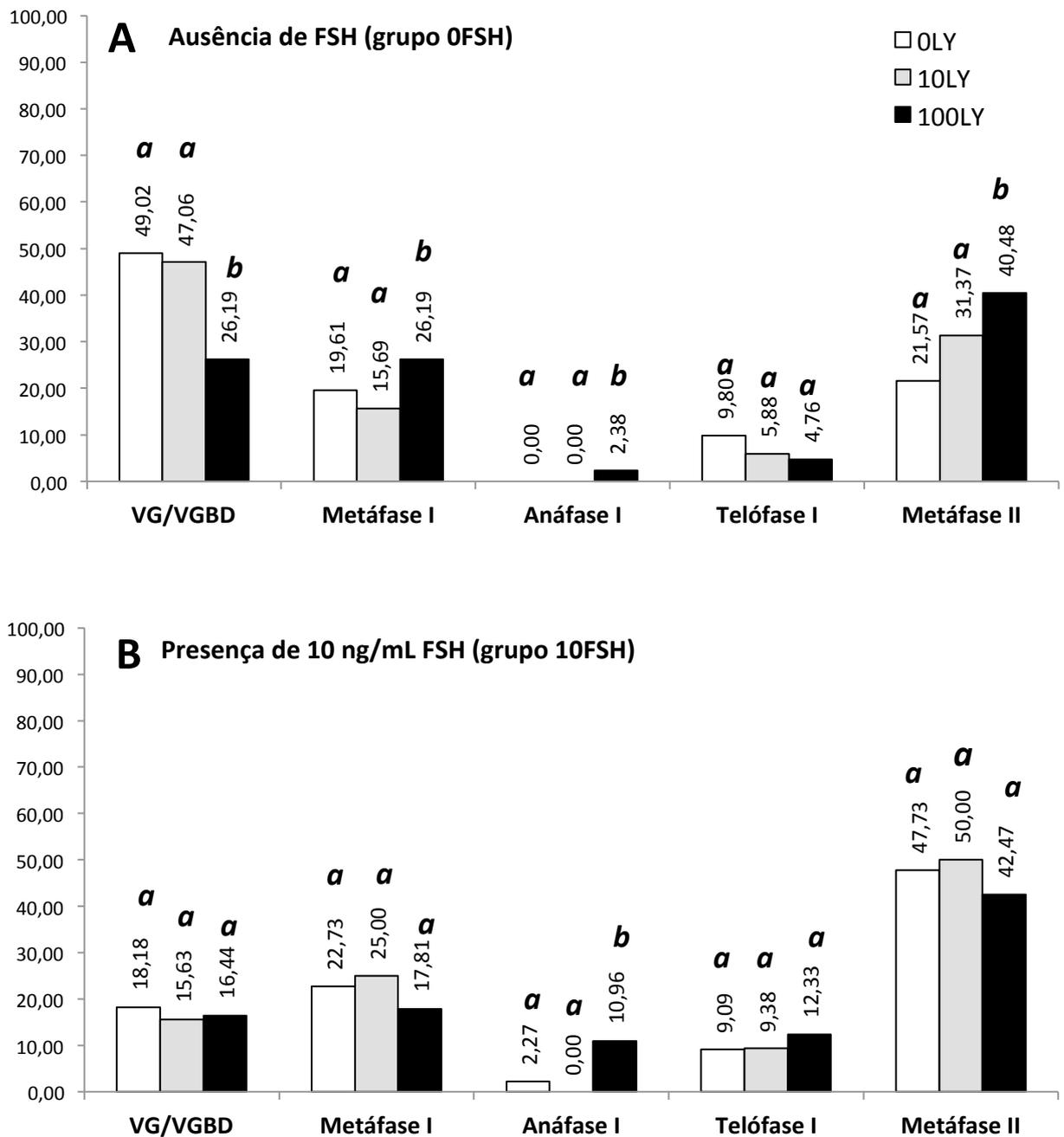


**Figura 10: Efeito *in vitro* do FSH (10 ng/mL) na maturação nuclear de ovócitos bovinos em meio definido MIV B.**

Prófase I: VG: vesícula germinativa; VGBD: quebra da vesícula germinativa.

Valores estão expressos em porcentagem de ovócitos que alcançaram o referido estágio de maturação nuclear (estágio da meiose).

\*Indica diferenças estatísticas entre os grupos 0FSH e 10FSH dentro de cada estágio de maturação nuclear (Teste qui ao quadrado de partição;  $p=0,0032$ ).



**Figura 11: Taxa de maturação nuclear de ovócitos cultivados em crescentes doses do inibidor LY294002, na ausência de FSH (A) ou na presença de 10 ng/mL de FSH (B).**

Prófase I: VG: vesícula germinativa; VGBD: quebra da vesícula germinativa.

Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos 0, 10 e 100 $\mu$ M LY294002 em cada estágio da meiose. Figura A ( $p < 0,0001$ ); Figura B ( $p = 0,0032$ ).

Valores estão expressos em porcentagem de ovócitos que alcançaram o referido estágio de maturação nuclear (estágio da meiose).

Teste estatístico: qui ao quadrado de partição.

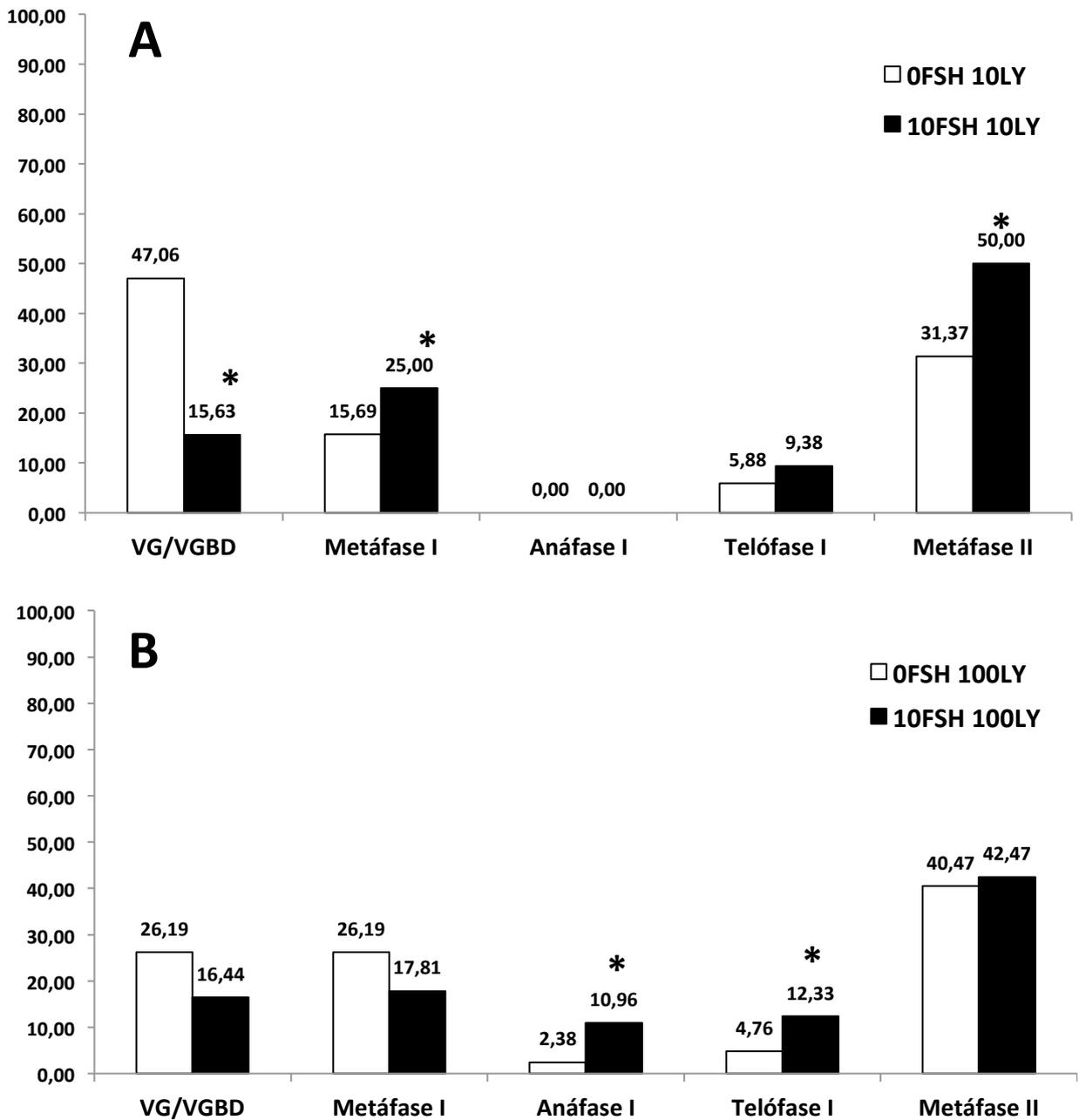
Ao comparar apenas a dose de 10 $\mu$ M do inibidor LY294002 no meio 0FSH e 10FSH (Figura 12A), observa-se que os resultados obtidos se assemelham aos resultados representados na Figura 10. Já na dose de 100  $\mu$ M de LY294002 (Figura 12B), nota-se a clara retomada e progressão da meiose no meio sem FSH (0FSH), com maior porcentagem de ovócitos em metáfase II.

Ao comparar os resultados dos grupos 0FHS 100LY e 10FSH observa-se que não há diferença, pois a dose de 100  $\mu$ M LY294002 causou significativa progressão da meiose no meio 0FSH (Figura 13). Isso indica que o inibidor da PI3-K causou a progressão da meiose no meio 0FSH elevando as taxas de maturação do ovócito para valores semelhantes ao meio 10FSH.

Após os experimentos preliminares citados, optou-se por utilizar apenas a concentração de 100  $\mu$ M do inibidor LY294002 nos experimentos subsequentes. Nesses experimentos, todos os ovócitos foram separados em dois grupos: ovócitos com e sem corpúsculo polar. Ovócitos com corpúsculo polar correspondem aos ovócitos que finalizaram a metáfase II até a expulsão completa do corpúsculo polar. Já ovócitos sem corpúsculo polar correspondem aos ovócitos nas demais fases ou que ainda não completaram a metáfase II com a completa expulsão do corpúsculo.

O meio 0FSH inibe e o meio 10FSH estimula a expulsão completa do corpúsculo (Figura 14). Entretanto, a presença de LY294002 nesse meio diminuiu significativamente a porcentagem de ovócitos que expulsam o corpúsculo polar tanto no meio 0FSH quanto no 10FSH (Figura 14).

Assim, demonstra-se que o inibidor LY294002 permite a progressão da maturação nuclear até metáfase II no meio 0FSH e para anáfase I no meio 10FSH, porém impediu significativamente a expulsão do corpúsculo polar.



**Figura 12: Efeito do inibidor LY294002 10  $\mu$ M (A) ou 100  $\mu$ M (B) sobre a taxa de maturação nuclear no meio definido MIV B sem ou com 10 ng/mL de FSH.**

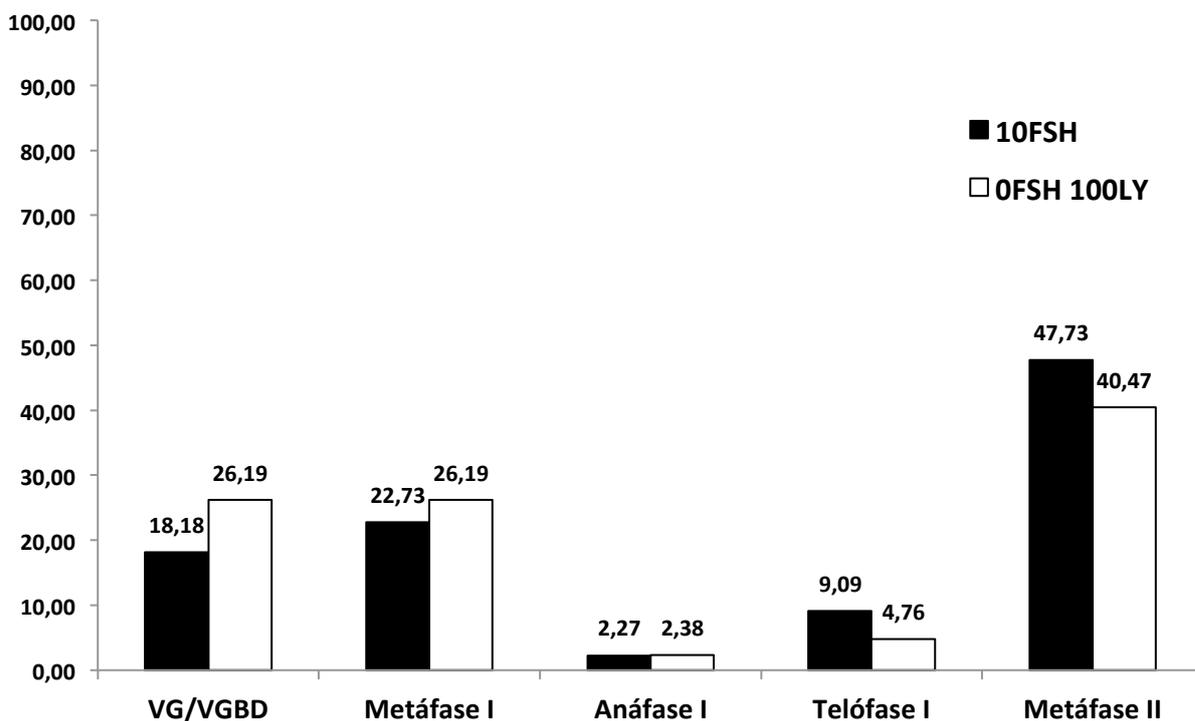
Prófase I: VG: vesícula germinativa; VGBD: quebra da vesícula germinativa.

Valores estão expressos em porcentagem de ovócitos que alcançaram o referido estágio de maturação nuclear (estágio da meiose).

Figura A: Taxa de maturação nuclear na presença de 10 $\mu$ M de LY294002.

Figura B: Taxa de maturação nuclear na presença de 100  $\mu$ M de LY294002

\*Indica diferenças estatísticas entre os grupos 0FSH e 10FSH dentro de cada estágio de maturação nuclear (Teste qui ao quadrado de partição,  $p=0,0032$ ).

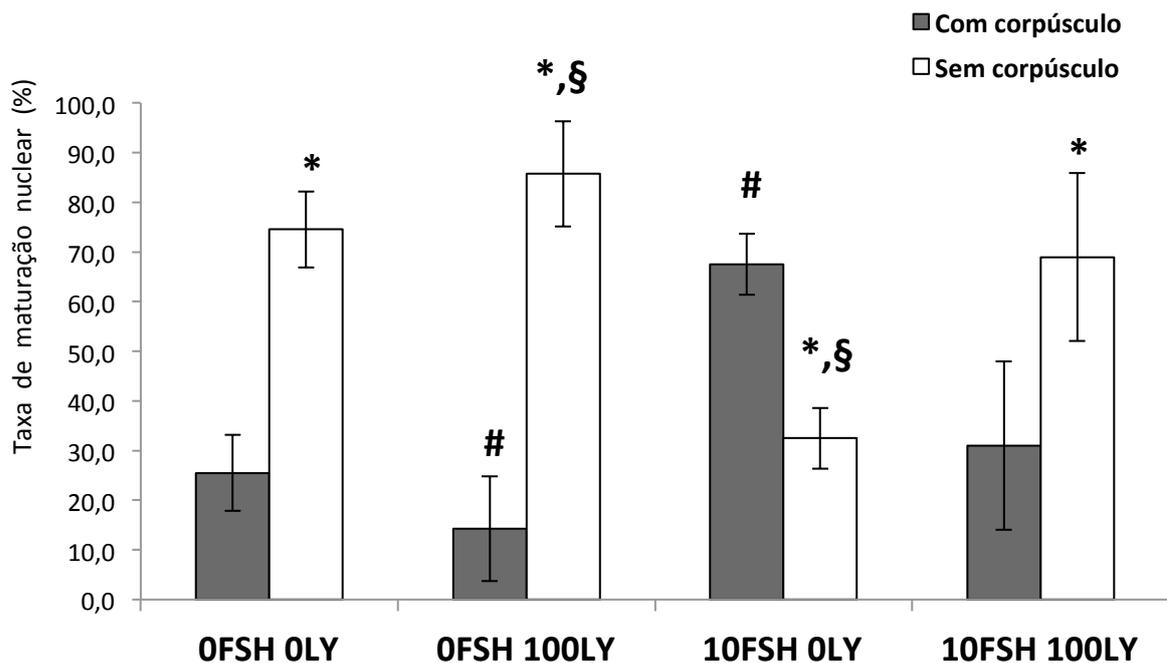


**Figura 13: Taxa de maturação nuclear no meio contendo FSH versus meio 0FSH 100LY.**

Prófase I: VG: vesícula germinativa; VGBD: quebra da vesícula germinativa.

Valores estão expressos em porcentagem de ovócitos que alcançaram o referido estágio de maturação nuclear (estágio da meiose).

Não há diferença estatística entre o grupo 10FSH0LY e o grupo 0FSH100LY (Teste qui ao quadrado de partição,  $p=0,4562$ ).



**Figura 14: Efeito do LY294002 100  $\mu$ M sobre a expulsão do corpúsculo polar de ovócitos cultivados no meio MIV B na ausência ou na presença 10 ng/mL de FSH.**

\* Indica diferenças entre os grupos com e sem corpúsculo dentro do mesmo tratamento (teste t,  $p < 0.05$ ).

A,B,C: Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos experimentais dentro dos grupos com corpúsculo ( $p < 0,05$ ; ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni).

D,E,F: Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos experimentais dentro dos grupos sem corpúsculo ( $p < 0,05$ ; ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni).

ANOVA de duas vias indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos com e sem FSH ( $p < 0,001$ ).

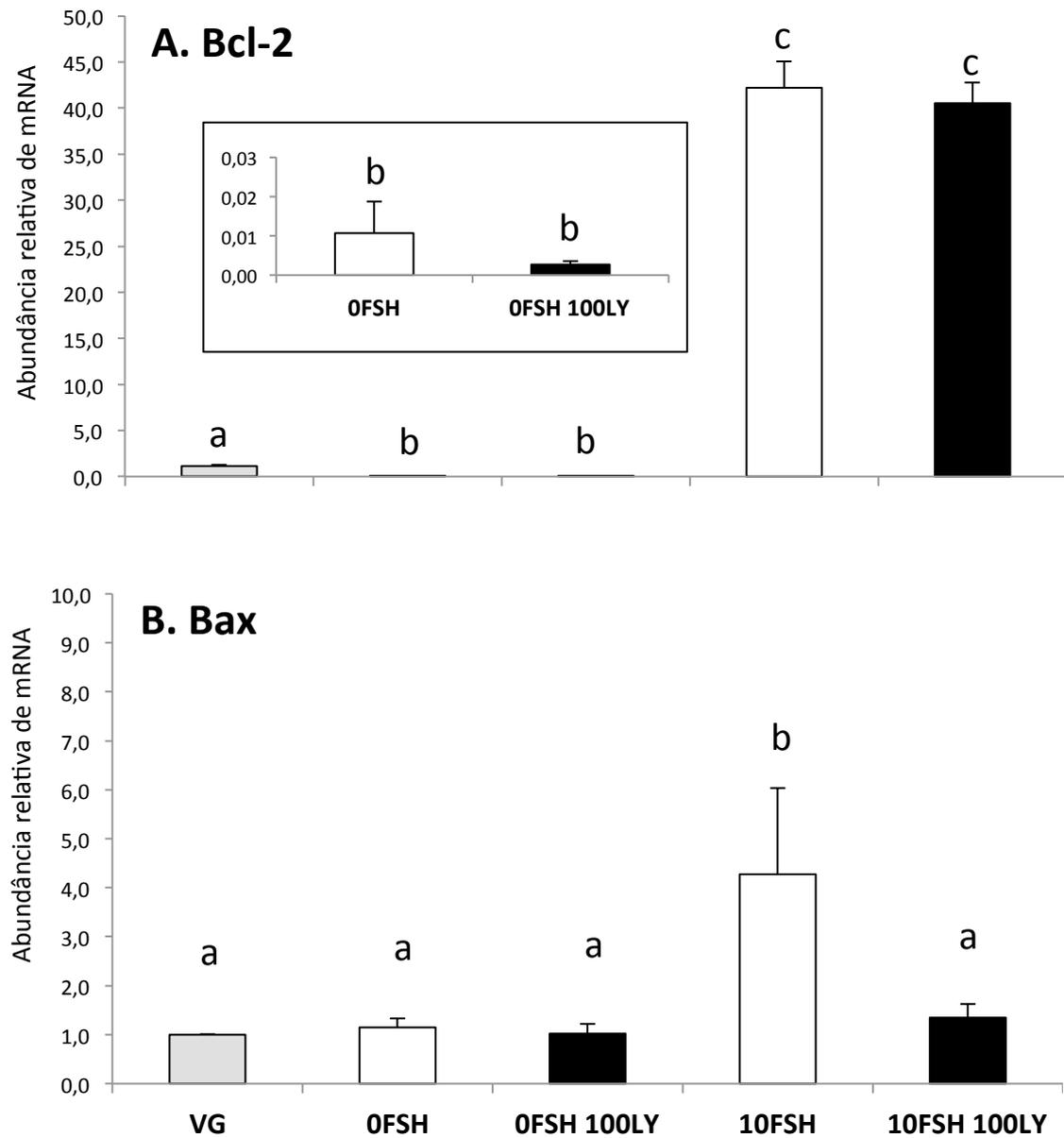
Valores são expressos como média e desvio-padrão da porcentagem de ovócitos com ou sem corpúsculo polar obtidos em cada experimento de MIV realizado.

Em termos de ação da via PI3-K sobre a viabilidade das células do *cumulus*, estudou-se a expressão do gene Bcl-2, proteína anti-apoptótica, e de Bax, pró-apoptótica. A adição de FSH (10FSH) ao meio MIV B estimulou significativamente a expressão gênica do Bcl-2 e do Bax comparado ao meio 0FSH (Figura 15). A relação Bcl-2/Bax também é maior no meio 10FSH quando comparado ao meio 0FSH (Figura 16).

Nos meios 0FSH e 0FSH 100LY os valores de Bcl-2 foram significativamente menores quando comparados ao VG (Figura 15A). Alta expressão de Bcl-2 nos meios 10FSH e 10FSH 100LY (Figura 15A) foi observada. Não há ação do inibidor sobre a expressão de Bcl-2.

Com relação à expressão de Bax, tem-se baixos valores nos meios 0FSH e 0FSH 100LY e elevação no meio 10FSH (Figura 15B). O meio 10FSH 100LY causa diminuição da expressão para valores próximos aos demais grupos (Figura 15B).

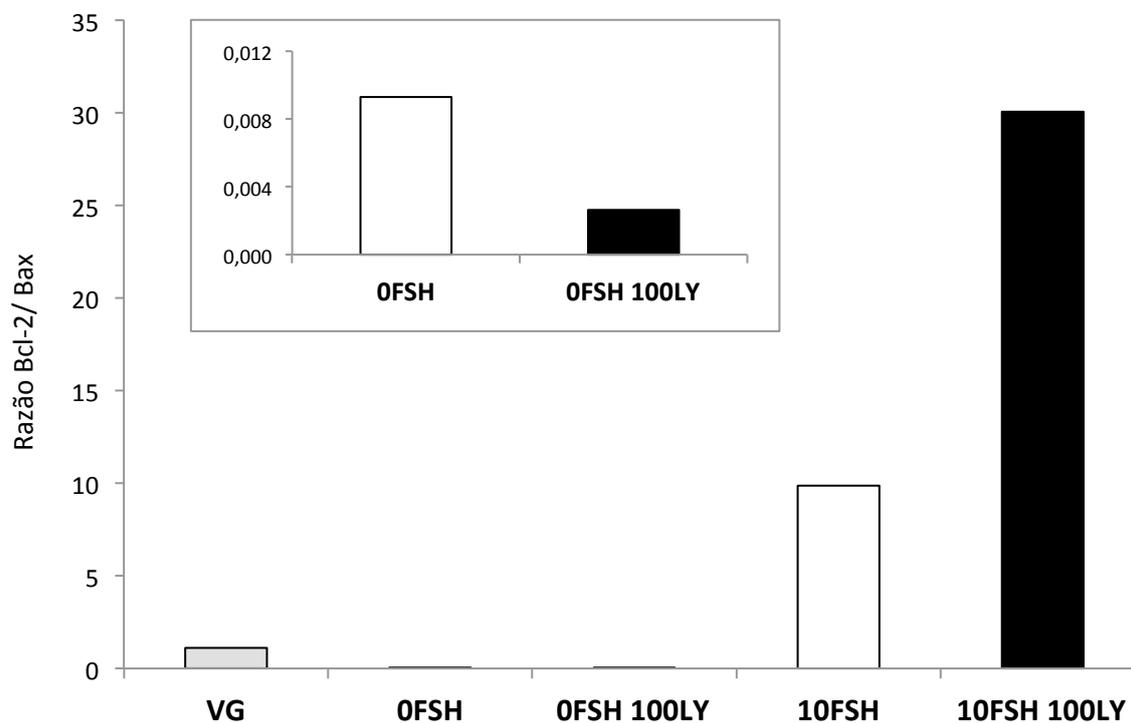
A razão entre a expressão de Bcl-2/Bax demonstra que, no meio 0FSH há maior proporção de Bcl-2 comparado ao meio 0FSH 100LY (Figura 16). Já nos meios contendo FSH, a proporção de Bcl-2 é maior no meio 10FSH 100LY quando comparado ao meio 10FSH (Figura 16).



**Figura 15: Expressão gênica relativas às proteínas Bcl-2 e Bax de células do *cumulus* provenientes de CCOs cultivados com e sem FSH e sob a presença ou ausência do inibidor da PI-3K (LY294002).**

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

O detalhe da Figura A corresponde à expressão de Bcl-2 nos grupos 0FSH e 0FSH 100LY, apenas para melhor visualização dos valores de quantificação relativa de mRNA. Todos os valores de expressão são padronizados pelo gene controle, CYC, e o grupo VG é utilizado como calibrador.



**Figura 16: Razão Bcl-2/Bax de células do *cumulus* provenientes de CCOs cultivados com e sem FSH e sob a presença ou ausência do inibidor da PI-3K (LY294002).**

A razão Bcl-2/Bax foi obtida pela divisão da média do valor de quantificação relativa de mRNA de Bcl-2 dividida pela média obtida de Bax, em cada um dos meios-teste.

Nenhuma avaliação estatística foi realizada.

O detalhe da figura mostra os valores dos grupos OFSH e OFSH 100LY.

## DISCUSSÃO

O meio sem FSH leva a imaturidade nuclear do ovócito, enquanto a presença de 10 ng/mL de FSH eleva esse valor significativamente. A inibição da via PI3-K causa a retomada da meiose até metáfase II no meio 0FSH e no meio 10FSH houve aumento da proporção de ovócitos em anáfase I. Entretanto, mesmo alcançando valores maiores de maturação nuclear, a expulsão do corpúsculo polar não condiz com esse perfil. Na referida dose de LY294002, a taxa de expulsão do corpúsculo polar é muito baixa nos meios 0FSH e 10FSH, indicando inibição significativa desse processo.

Em termos de marcadores de apoptose celular, os resultados indicam uma baixa expressão de Bcl-2 e Bax nos meios 0FSH e a presença do inibidor da PI3-K não causou efeito. Interessantemente, a presença de FSH estimulou a expressão de Bcl-2 e Bax, enquanto no meio 10FSH 100LY diminuiu apenas a expressão de Bax.

Os efeitos do meio MIV B sobre a maturação ovocitária e a produção de embrião já haviam sido descritos previamente e resultados positivos foram demonstrados, como por exemplo, a capacidade de gerar a mesma proporção de embriões (blastocistos) comparativamente ao meio comercialmente utilizado e a adição de FSH a esse meio, nas doses de 1 ou 10 ng/mL, não modificam essa proporção (GULART, 2009). Portanto, em termos de biotécnicas na área reprodutiva de bovinos, temos um grande avanço já que se trata de um meio mais barato que o comercial, pois não contém hormônios.

A importância da via PI3-K para diversas fases do desenvolvimento folicular já foi bem descrita na literatura (revisado por ZHENG *et al.*, 2012 e SOBINOFF *et al.*, 2013), entretanto pouca relevância foi atribuída a maturação nuclear *in vivo* e *in vitro*, o que não foi corroborado pelo presente trabalho. Estamos apresentando resultados usando um meio de cultivo sem grande quantidade de aditivos hormonais e observou-se o efeito relevante dessa via na maturação de ovócitos no meio sem e com FSH.

Com relação ao perfil morfológico, é bem descrito o efeito do FSH na expansão das células do *cumulus* de CCOs (SIRARD, DESROSIER e ASSIDI, 2007; CALDER *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 1990; ARMSTRONG *et al.*, 1996) e que o meio MIV B isoladamente não é capaz de estimular esse processo, mesmo na presença de androstenediona e outros hormônios (OLIVEIRA e SILVA, 2008; OLIVEIRA e SILVA *et al.*, 2011; GULART, 2009).

*In vivo* a expansão do *cumulus* é induzida pelo LH enquanto que *in vitro* o FSH pode exercer esse papel por elevar a concentração intracelular de cAMP (DEKEL e KRAICER, 1978; SALUSTRI *et al.*, 1989). A expansão das células do *cumulus in vivo* já foi mostrado como um bom preditor para a geração de embriões após a fertilização *in vitro* (AARDEMA *et al.*, 2013). A composição da matriz extracelular secretada por ação do FSH contém grandes quantidades de ácido hialurônico (SALUSTRI *et al.*, 1989) e a presença desse último componente está envolvido na maturação nuclear e no desenvolvimento embrionário *in vitro* (MAREI *et al.*, 2012).

O perfil da expansão das células do *cumulus* dos resultados apresentados denota a grande influência do hormônio gonadotrófico FSH, porém nenhuma influência da via PI3-K sobre esse parâmetro. Já foi demonstrado que o LY294002 inibiu a expansão das células do *cumulus* causada pela presença do FSH de CCOs suínos (PROCHAZKA, BLAHA e NEMCOVA, 2012) e de camundongo (HOSHINO *et al.*, 2004) cultivados *in vitro*. Doses elevadas podem até causar degeneração das células do *cumulus* após 24 horas de cultivo (PROCHAZKA, BLAHA e NEMCOVA, 2012).

Entretanto, Anas e colaboradores (1998) descreveram que não há efeito dos inibidores da PI3-K sobre a expansão das células do *cumulus* de CCOs bovinos. Os resultados de Anas e colaboradores corroboram com os resultados ora apresentados e demonstram também que há clara diferença entre espécies.

Em relação à maturação nuclear baseada nas características das fases da meiose e na expulsão do corpúsculo polar, observa-se claramente que o meio ausente de FSH inibe a progressão da meiose, enquanto a presença de 10 ng/mL de FSH estimula significativamente. O meio MIV B é reconhecidamente inibitório sobre a maturação nuclear e que o FSH desbloqueia esse processo de maturação (MOTA *et al.*, 2014; OLIVEIRA e SILVA, 2008; OLIVEIRA e SILVA *et al.*, 2011). Como descrito anteriormente, o FSH *in vitro* é capaz de estimular a finalização da meiose de forma dose-dependente (LU *et al.*, 2014; MITO *et al.*, 2013; ROBERTS *et al.*, 2004).

O bloqueio da maturação nuclear causado pelo MIV B é, em parte, explicado pela ação da PI3-K, pois no meio 0FSH 100LY houve aumento das taxas de metáfase I, anáfase I e metáfase II. Já no meio 10FSH 100LY houve aumento da proporção de ovócitos em anáfase I. Entretanto, houve inibição significativa da

expulsão do corpúsculo polar em ambos os meios e em comparação com os meios ausentes de LY294002.

Hoshino e colaboradores (2004) obtiveram resultado diferente, em parte, dos resultados obtidos no presente trabalho: o LY294002 inibiu a quebra da vesícula germinativa (VGBD) e a expulsão do corpúsculo polar (metáfase II) de CCOs de camundongo *in vitro*. O mesmo resultado foi obtido em ovócitos desnudos, ou seja, cultivados isoladamente, logo demonstra-se que a via PI3-K do ovócito também está relacionada ao resultado encontrado. Os resultados descritos pelos autores supracitados corroboram parcialmente com os nossos, pois há clara inibição da extrusão do corpúsculo nos ovócitos cultivados na presença do LY294002.

Prochazka, Blaha e Nemcova (2012) demonstraram que o inibidor LY294002 não bloqueou completamente a progressão da meiose na presença de FSH, porém poucos chegaram até o estágio de metáfase II em CCOs suínos. Baixas doses (5–10  $\mu\text{M}$ ) desse inibidor bloquearam a progressão da meiose enquanto altas concentrações (15 – 50  $\mu\text{M}$ ) os ovócitos ultrapassaram a fase de VGBD e estacionaram na primeira meiose. A inibição da MAPK impede a maturação nuclear (EBELING, TÖPFER e MEINECKE, 2011), sendo essa via também regulada pela proteína PI3-K.

Com relação à progressão da meiose observada nos resultados da presente tese, Carnero e Lacal (1998) já havia demonstrado um efeito dose dependente sobre a maturação nuclear causada pela wortmanina e pelo LY294002, porém doses de 100  $\mu\text{M}$  foram tidas como inibitórias sobre o processo de meiose.

Os resultados também se assemelham aos dados de Anas e colaboradores (1998) também utilizando CCOs bovinos em cultura. O uso de dois inibidores da via PI3-K na presença de FSH, a wortmanina e o LY294004, estimulou a retomada e a progressão da meiose para as etapas de metáfase I e, no caso da wortmanina, até anáfase I e telófase I. Entretanto, houve inibição da progressão da meiose até metáfase II (ANAS *et al.*, 1998). O cultivo do ovócito desnudo em ambos os inibidores não mudou o perfil dos resultados obtidos (ANAS *et al.*, 1998).

O cultivo de CCOs suínos por 28 horas em meio contendo LY294002 elevou as taxas de ovócitos em VG e metáfase I e um resultado semelhante foi obtido ao inibir-se a MAPK. Após o cultivo por 44 horas, observaram-se maiores taxas de metáfase II comparativamente às 28 horas de cultivo, porém inferior as taxas obtidas após cultivo no meio controle (SHIMADA, ZENG e TERADA, 2001). A atividade da

MAPK também foi significativamente diminuída pela presença do inibidor da PI3-K em cultivo de CCOs, indicando que a via controla a progressão da meiose até metáfase I na presença de FSH (SHIMADA, ZENG e TERADA, 2001).

Nesse mesmo experimento, após 20 horas de cultivo de CCOs na presença de LY294002, a atividade da CDK1, proteína responsável pela progressão da meiose, é baixa, mas após 22 até 44 horas de cultivo a atividade da CDK1 aumenta novamente indicando o desbloqueio da meiose (SHIMADA, ZENG e TERADA, 2001). Foi demonstrado também que a regulação da progressão da meiose por parte da via PI3-K/MAPK das células do *cumulus* pode ser independente da via encontrada no ovócito (SHIMADA e TERADA, 2001).

Uma das possíveis ações da PI3-K sobre a maturação nuclear é atuando sobre a proteína Akt/PKB (HOSHINO *et al.*, 2004). A Akt induzida pela presença de FSH é encontrada no fuso meiótico e o uso do inibidor da PI3-K diminui significativamente a presença e expressão da Akt fosforilada (forma ativa) no fuso responsável pela divisão celular.

Logo, observa-se uma gama de resultados que podem demonstrar os efeitos da via PI3-K sobre ovócitos de espécies diferentes e condições experimentais diferentes. Observa-se nos resultados da presente tese uma forte influência do FSH sobre a maturação nuclear comparativamente ao meio sem FSH. Na ausência de FSH a relevância da via PI3-K é mais pronunciada, pois houve uma desinibição da meiose, porém no meio contendo FSH esse perfil foi menos pronunciado.

Com relação à expulsão do corpúsculo polar, que foi significativamente inibida pela presença do LY294002, sabe-se que a organização do citoesqueleto (F-actina) e do fuso meiótico é dependente da produção de fosfatidilinosíteis fosfatados, que podem ser derivados da via PI3-K. A inibição da síntese desses compostos pelo uso do LY294002 altera a F-actina e a migração do fuso meiótico para a região periférica do ovócito, portanto pode-se atribuir os resultados obtidos no presente trabalho a esse fato (ZHENG *et al.*, 2013).

Em termos de apoptose celular, os genes Bcl-2 e Bax podem ser usados como marcadores de viabilidade celular, pois a expressão de Bcl-2 está relacionada à sobrevivência e Bax à apoptose. Dados demonstram que a expressão de Bax e Bcl-2 não tem relação direta com o aspecto morfológico de CCOs após o cultivo (LEON *et al.*, 2013), pois a expressão de ambos em CCOs se mantém relativamente constante no período de cultivo *in vitro* (LEON *et al.*, 2013; SALHAB *et al.*, 2011). Porém, há

aumento da expressão de Bax em células do *cumulus* de CCOs com morfologia degenerada antes do cultivo e o meio de cultura foi capaz de resgatar esses possíveis CCOs em degeneração (LEON *et al.*, 2013).

A via PI3-K/Akt/GSK3 controla o processo de apoptose celular (ENGELMAN, LUO e CANTLEY, 2006; BEUREL e JOPE, 2006) e o cultivo com o inibidor LY294002 causa aumento no número de células do *cumulus* apoptóticas após cultivo de CCOs de suínos *in vitro*, mesmo na presença de FSH (SHIMADA *et al.*, 2003). As vias PI3-K/Akt e MAPK estão envolvidas na regulação da expressão gênica e na tradução da proteína de Bcl-2 e Bax (XIE *et al.*, 2014).

No presente trabalho os valores de expressão gênica de Bcl-2 e Bax dos meios 0FSH foram muito baixos comparativamente aos meios 10FSH e a ação do inibidor da PI3-K, o LY294002, não é significativa. Entretanto, diferenças pronunciadas apareceram na presença de FSH. A expressão de Bcl-2 é alta nos meios contendo FSH, independente da presença de LY294002, mas a expressão de Bax é aumentada no meio contendo 10FSH comparativamente ao meio 10FSH 100LY, indicando, nesse caso, o efeito da via PI3-K.

A ausência de FSH não modifica o padrão de expressão de Bax, porém quando comparado ao VG (CCO imaturo), observa-se menores valores de Bcl-2, mostrando a importância do FSH em termos de expressão gênica desse relevante gene anti-apoptótico. Já foi relatado que o FSH em cultivo mantém o nível de expressão gênica do Bcl-2 em células da granulosa (MANI *et al.*, 2010).

Com relação a regulação da expressão dos genes de apoptose celular por parte do FSH, tem-se que os níveis de Bcl-2 não foram alterados pelo cultivo de células da granulosa na presença de FSH, porém os valores de expressão de Bax só foram reduzidos na maior concentração de FSH (50 ng/mL) (MANI *et al.*, 2010), indicando que o FSH mantém a expressão de Bax elevada em comparação à concentrações menores de FSH. A presença de IGF1 e FSH os valores Bax tendem a aumentar significativamente quando comparados ao cultivo com FSH isoladamente, indicando que os dois hormônios potencializam a expressão de Bax por meio da via PI3-K/Akt, enquanto Bcl-2 não sofre alteração (MANI *et al.*, 2010).

A presença de hormônios esteróides também pode estar relacionado ao perfil de viabilidade celular. A adição de 17 beta-estradiol, por exemplo, reduz estresse oxidativo e diminui a presença de proteína Bax em cultura de células nervosas e a via PI3-K tem papel essencial no efeito protetor exercido pelo estradiol e na

supressão do efeito apoptótico de Bax, além de aumentar a expressão de Bcl-2 (LI *et al.*, 2013a; LI *et al.* 2013b).

Conclui-se que a ação da via PI3-K controla a progressão da meiose e a expulsão do corpúsculo polar diferentemente, porém não possui controle sobre a expressão de Bcl-2 em células do cumulus de CCOs após cultivo. Apenas Bax sofre controle da ação da via PI3-K na presença de FSH.

## **CAPÍTULO II**

### **ESTEROIDOGÊNESE DAS CÉLULAS DO *CUMULUS* E EXPULSÃO DO CORPÚSCULO POLAR**

**Ação da via PI3-K em meio definido patenteado suplementado ou  
não com FSH**

## INTRODUÇÃO

A esteroidogênese (Figura 17A) é uma das funções gonadais mais importantes do folículo ovariano e do corpo lúteo e o FSH e o LH tem papéis fundamentais na esteroidogênese ovariana. Classicamente, o FSH tem ação sobre as células da granulosa e o LH sobre as células da teca, correspondendo à teoria das duas células, duas gonadotrofinas (Figura 17B) (GRIFFIN e OJEDA, 2004).

Assim, o LH estimula as células da teca a produzirem androstenediona, enquanto as células da granulosa, sob estímulo do FSH, convertem androstenediona a 17 beta-estradiol. As células da teca também são capazes de secretar progesterona (Figura 17B). O estímulo de ambos os hormônios sobre a produção de esteróides leva a expressão do gene e atividade das enzimas presentes em cada tipo celular, sendo que a expressão já foi descrita como marcador para folículos ovarianos em crescimento (BAO *et al.*, 1997).

Ovócitos provenientes de folículos contendo menos que 100 pg/mL de 17 beta-estradiol possuem menor taxa de clivagem e menor proporção de formação de blastocistos (embrião na fase pré-implantação) quando comparados aos ovócitos provenientes de folículos contendo maiores concentrações de 17 beta-estradiol (ARAKI *et al.*, 1998), demonstrando a relevância da esteroidogênese para os procedimentos de geração de embriões *in vitro*.

O FSH, que é utilizado em diversos procedimentos de maturação *in vitro* e *in vivo* de CCOs, atua sobre as vias de sinalização PI-3K/Akt e cAMP/PKA (STOCCO, 2008) para induzir a expressão de aromatase (CYP19), enzima-chave para a produção de estrógenos. Os estrógenos potencializam a ação do FSH sobre as células do *cumulus*, levando o folículo ovariano a se tornar pré-ovulatório (STOCCO, 2008). Sinais intra-ovarianos produzidos pelo ovócito, como os mediadores parácrinos GDF9 e o BMP15, diminuem a ação do FSH sobre as células da granulosa antral e do *cumulus* e diminuem a transcrição gênica da enzima aromatase, que é responsável por sintetizar o 17 beta-estradiol (OTSUKA *et al.*, 2001; SPICER *et al.*, 2006; VITT *et al.*, 2000).

Há diferentes subtipos de células da granulosa: mural, antral e do *cumulus*, que possuem capacidades esteroidogênicas diferenciadas. Sob ação do FSH *in vitro*, as células do *cumulus* produzem mais progesterona comparativamente às células da granulosa murais, por exemplo (ARMSTRONG *et al.*, 1996).

A capacidade esteroidogênica das células do *cumulus* é pouco compreendida, porém, sabe-se que o perfil esteroidogênico dos CCOs *in vitro* modifica-se de acordo com o precursor utilizado para cultivo e com a adição de hormônios. Mingoti, Garcia e Rosa e Silva (2002) descreveram que a suplementação de progesterona influencia claramente a produção de 17 beta-estradiol e vice-versa. Por exemplo, a suplementação de 1 µg/mL de progesterona aumenta significativamente a produção de estradiol após 24 horas de cultivo na presença de FSH e hCG (MINGOTI, GARCIA e ROSA E SILVA, 2002).

Com relação à influência dos hormônios esteróides sobre a maturação nuclear de ovócitos *in vitro*, Wang e colaboradores (2006) descreveram o uso do inibidor aminoglutetimida (AGT), que bloqueia a produção de diversos hormônios esteróides e entre eles se encontram a progesterona e o 17 beta-estradiol. Esse processo causa a diminuição significativa da maturação nuclear dos CCOs (ao redor de 10% na concentração de 10 mM de AGT) e da expansão das células do *cumulus in vitro*, mesmo na presença de FSH, indicando a ação fisiológica dos hormônios esteróides na maturação ovocitária.

Porém, ao cultivar os CCOs em meio básico de acondicionamento, e mesmo na presença do AGT, não há diferença na proporção de ovócitos que maturam, logo conclui-se que há outros fatores além dos hormônios esteróides que também influenciam na maturação do ovócito *in vitro* (WANG *et al.*, 2006).

Outro dado importante obtido por Wang e colaboradores (2006) é que a adição de concentrações crescentes de progesterona ou 17 beta-estradiol no meio de cultivo de CCOs, na presença do inibidor AGT, não altera a taxa de maturação do ovócito e nem da expansão das células do *cumulus*. Novamente, indica-se a importância de outros elementos no meio de cultura e produzidos pelos próprios CCOs que contribuem de forma sinérgica para o amadurecimento do ovócito *in vitro*.

A ação do FSH sobre a esteroidogênese e a transcrição de enzimas relacionadas à esteroidogênese é bem documentada, entretanto a ação desse hormônio *in vitro* sobre a esteroidogênese das células do *cumulus* ainda precisa ser melhor elucidada, pois a maioria dos trabalhos publicados utiliza células da granulosa isoladas de folículos ovarianos (GUTIERREZ *et al.*, 1997; SILVA e PRICE, 2002; SAHMI *et al.*, 2006).

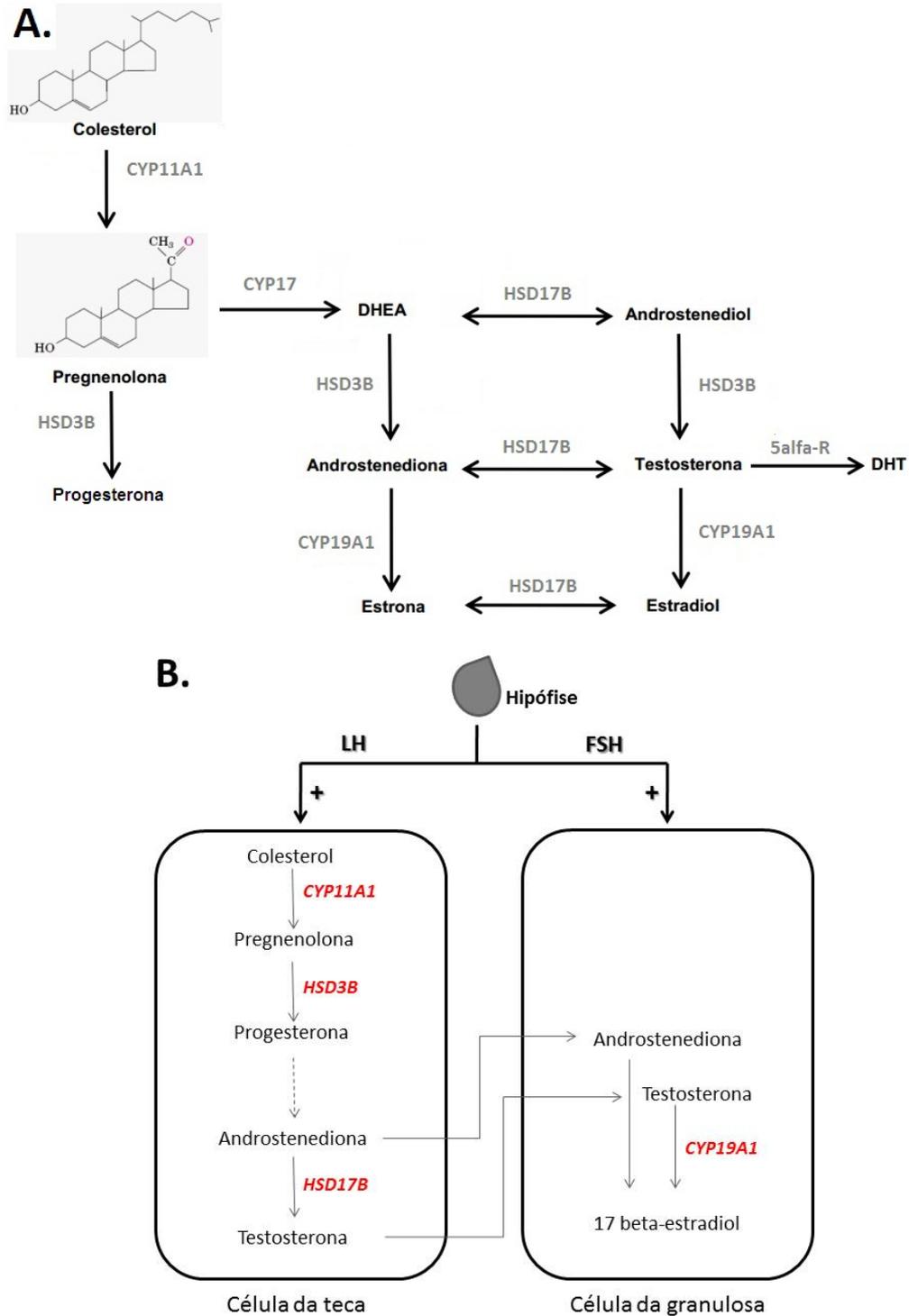
Ao inibir a via PI3-K com o uso do inibidor LY294002 há queda na produção de progesterona por parte de células do *cumulus* de CCOs (SHIMADA *et al.*, 2003) e de células da granulosa (CHENG *et al.*, 2007) *in vitro*, mesmo na presença de FSH.

Inibindo a via MAPK, que também pode ser controlada pelo FSH e pela via PI3-K, há aumento na secreção de estradiol e diminuição na secreção de progesterona em células do *cumulus* e da granulosa em cultivo (EBELING, TÖPFER e MEINECKE, 2011; SU *et al.*, 2006; MOORE, OTSUKA e SHIMASAKI, 2001; YU *et al.*, 2005). Logo, tem-se várias evidências de que a via PI3-K/MAPK tenham o controle da esteroidogênese.

A concentração local de hormônios esteróides é controlada pelas enzimas que os sintetizam. A enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol (CYP11A1) é responsável pelo passo inicial para a síntese dos esteróides sexuais. A enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (HSD3B) é a enzima responsável pela síntese de progesterona (ISOBE *et al.*, 2003) (Figura 17A).

A enzima aromatase (CYP19A1) converte andrógenos em estrógenos (SIMPSON *et al.*, 1994). Já a enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase 1 (HSD17B1) converte estrona em 17 $\beta$ -estradiol (Figura 17A) e a 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase 2 converte 17 $\beta$ -estradiol em estrona (LABRIE *et al.*, 2000).

Diversos trabalhos já demonstraram o efeito da via PI3-K sobre a esteroidogênese (CHENG *et al.*, 2007; MOORE, OTSUKA e SHIMASAKI, 2001; EBELING, TÖPFER e MEINECKE, 2011; MANI *et al.*, 2010). Portanto, os genes dos receptores de FSH (FSHR) e LH (LHR), das enzimas CYP11A1, CYP19A1 e HSD17B1 serão investigados nas células do *cumulus* isoladas de CCOs, bem como a concentração final de progesterona e 17 beta-estradiol no meio de cultivo para determinar os efeitos sobre a esteroidogênese de CCOs bovinos e sua relação com a maturação do ovócito. Além disso, descreveremos pela primeira vez a esteroidogênese de células do cumulus de CCOs cultivados no meio MIV B e a ação do FSH nessas condições.



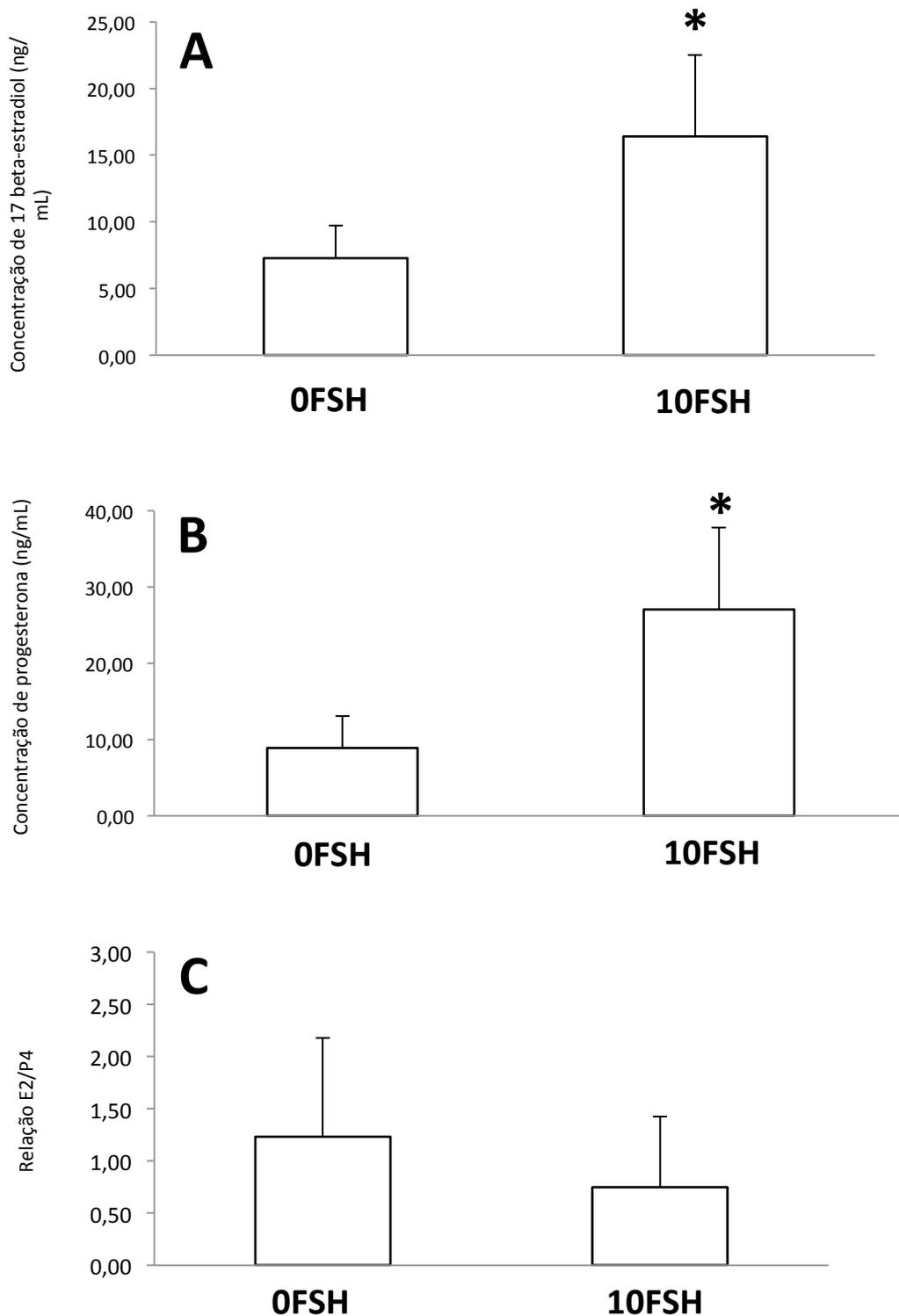
**Figura 17: Via de síntese e enzimas-chave de hormônios esteróides sexuais e a teoria das duas células, duas gonadotrofinas.**

Enzimas mitocondriais: CYP11A1 (enzima que cliva a cadeia lateral do colesterol); CYP17 (catalisa a reação de 17-hidroxição) e CYP19A1 (aromatase). Enzimas não-mitocondriais: HSD17B (17 beta-hidroxiesteróide desidrogenase), HSD3B (3 beta-hidroxiesteróide desidrogenase) e 5alfa-R (5 alfa-redutase). Modificado de Griffin e Ojeda, 2004.

## RESULTADOS

O cultivo dos CCOs nos meios MIV B 0FSH e 10FSH demonstra que a concentração final de 17 beta-estradiol e progesterona nos meios contendo 10 ng de FSH/mL é significativamente maior quando comparados aos meios sem FSH (Figura 18). Não houve diferença entre a relação E2/P4 entre os meios com e sem FSH, mantendo-se, aproximadamente, uma relação de 1:1 entre os valores de estradiol e progesterona (Figura 18).

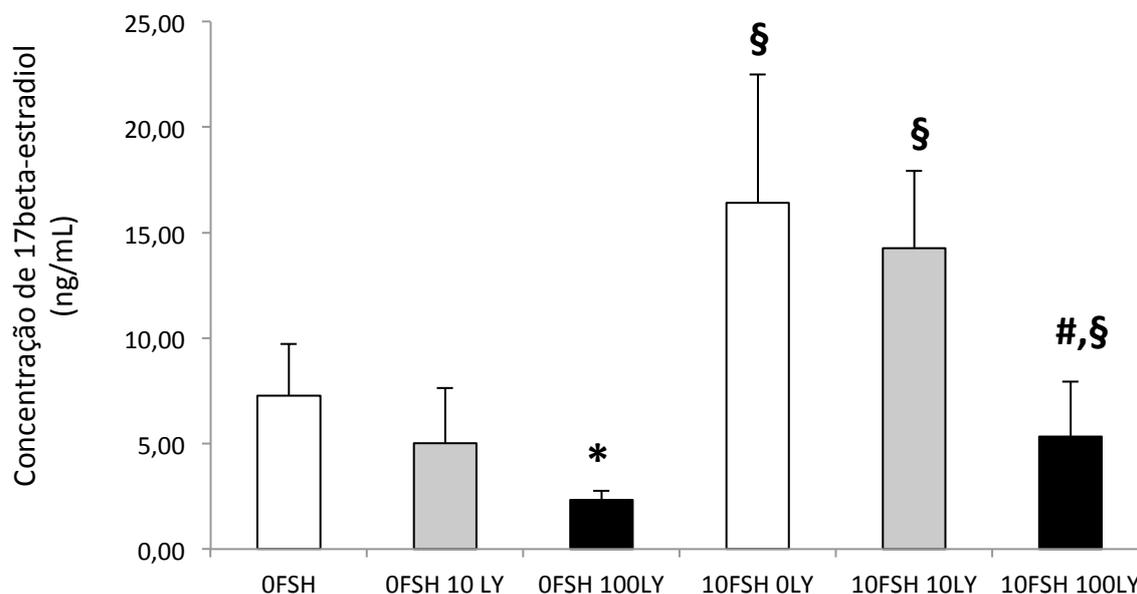
Com relação a ação da via PI3-K, a dose de 100  $\mu$ M de LY294002 foi capaz de diminuir a produção de estradiol em ambas as situações, ou seja, com ou sem FSH no meio ( $p < 0,05$ ). O inibidor LY294002 não demonstrou efeito sobre a produção de progesterona nos meios 10FSH ( $p > 0,05$ ), entretanto, aumentou significativamente a produção de progesterona no meio 0FSH 100LY (Figura 20). Não houve efeito da dose de 10  $\mu$ M de LY294002.



**Figura 18: Efeito da presença de 10 ng/mL de FSH sobre a concentração final de 17 beta-estradiol (A), progesterona (B) e relação E2/P4 (C) após cultivo de CCOs bovinos em MIV B.**

\* Indica diferença estatística entre os meios 0FSH e 10FSH (teste t de Student,  $p < 0,05$ ).

Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



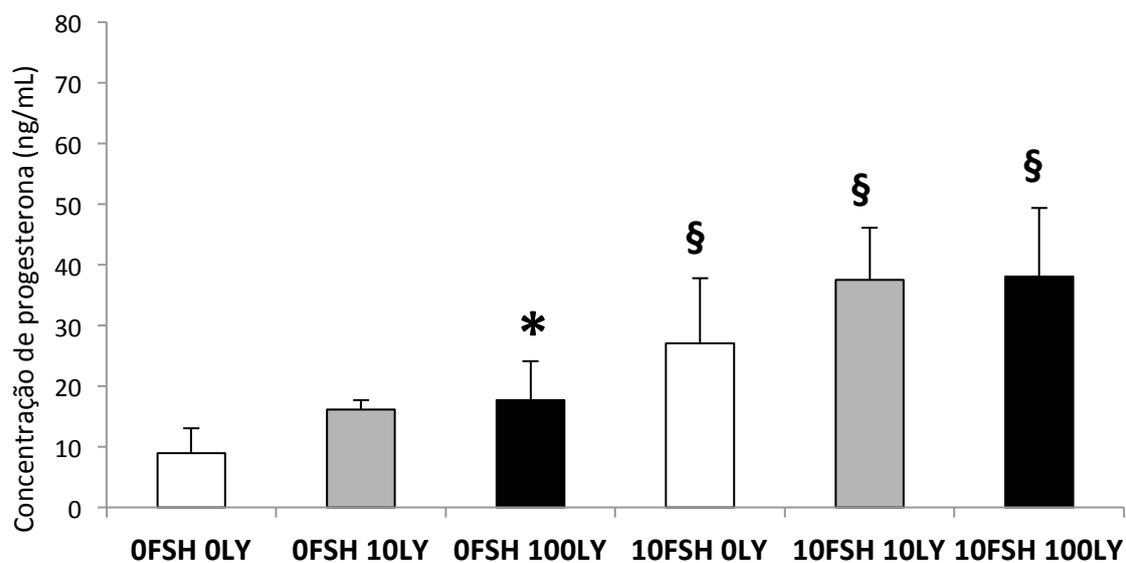
**Figura 19: Concentração de 17 beta-estradiol nos meios de cultura de CCOs bovinos na presença ou ausência de FSH e sob diferentes doses do inibidor LY294002.**

\* Indica diferença estatística versus 0FSH 0LY (ANOVA de uma via,  $p < 0,05$ ).

# Indica diferença estatística versus 10FSH 0LY e 10FSH 10LY (ANOVA de uma via,  $p < 0,05$ )

§ Indica diferença significativa entre os grupos 0FSH e 10FSH em cada uma das doses do inibidor LY294002 (teste t de Student,  $p < 0,05$ ).

ANOVA de duas vias indica que há diferença entre os perfis dos grupos 0FSH e 10FSH e suas respectivas doses do inibidor ( $p = 0,0007$ ).



**Figura 20: Concentração de progesterona nos meios de cultura de CCOs bovinos na presença ou ausência de FSH e sob diferentes doses do inibidor LY294002.**

\* Indica diferença estatística versus 0FSH 0LY (ANOVA de uma via,  $p < 0,05$ ).

Não há diferença entre os três grupos contendo 10FSH.

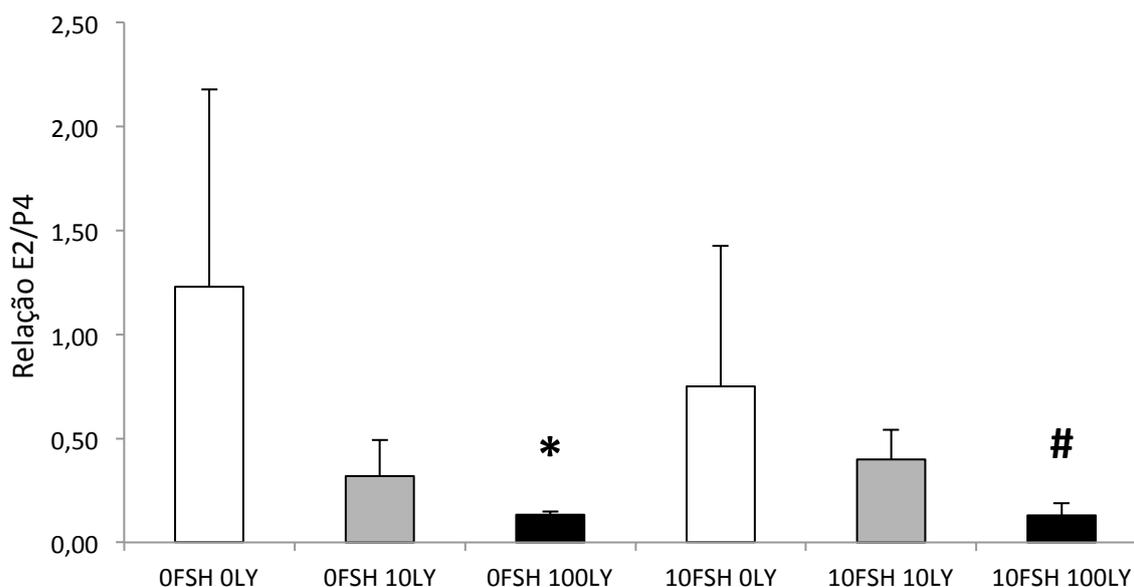
§ Indica diferença significativa entre os grupos 0FSH e 10FSH em cada uma das doses do inibidor LY294002 (teste t de Student,  $p < 0,05$ ).

ANOVA de duas vias indica que há diferença entre os perfis dos grupos 0FSH e 10FSH e suas respectivas doses do inibidor ( $p < 0,0001$ ).

Analisando-se a razão E2/P4, observa-se que a dose de 100  $\mu$ M de LY294002 reduziu significativamente os valores da razão tanto na presença quanto na ausência de FSH (Figura 21) quando comparado ao meio ausente de LY294002.

Ao relacionar-se a produção de 17 beta-estradiol e a expulsão do corpúsculo polar, ou seja, a maturação final do ovócito obtém-se uma correlação estatisticamente significativa (Figura 22A;  $R^2=0,564$ ,  $p=0,0020$ ). Entretanto a mesma relação não é observada em relação à progesterona (Figura 22B;  $R^2=0,009$ ,  $p=0,73$ ) nos meios após o cultivo dos CCOs.

Com os resultados prévios, excluiu-se a dose de 10 $\mu$ M.



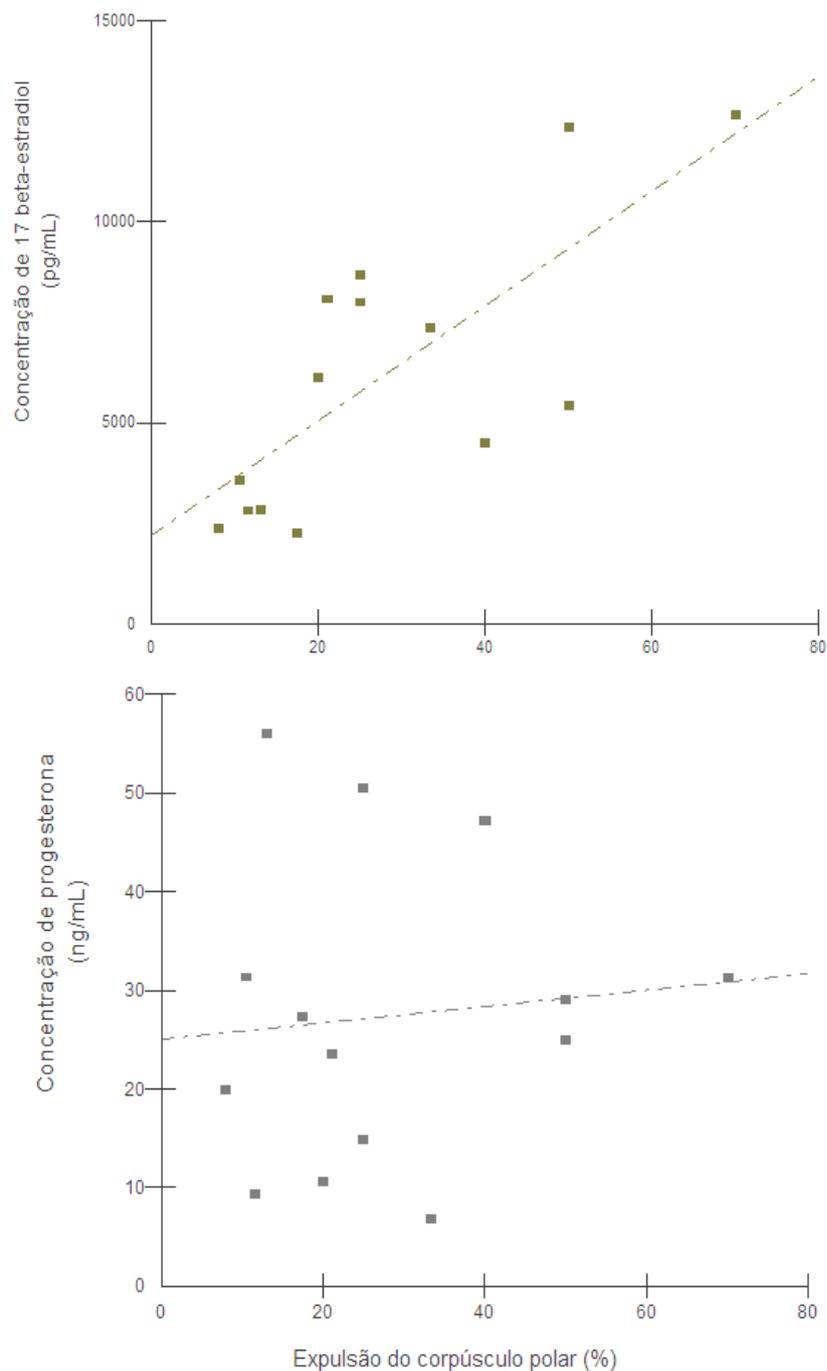
**Figura 21: Razão E2/P4 nos meios de cultura de CCOs bovinos na presença ou ausência de FSH e sob diferentes doses do inibidor LY294002.**

A razão E2/P4 provém da divisão dos valores de 17 beta-estradiol (ng/mL) pelo valor de progesterona (ng/mL) de cada amostra isoladamente.

\* Indica diferença estatística versus 0FSH 0LY (ANOVA de uma via,  $p<0,05$ ).

# Indica diferença estatística versus 10FSH 0LY (ANOVA de uma via,  $p<0,05$ ).

Não há diferença quando se compara o perfil dos grupos 0FSH e 10FSH e suas respectivas doses do inibidor (ANOVA de duas vias,  $p>0,05$ ).



**Figura 22: Correlação entre produção de 17 beta-estradiol ou progesterona e expulsão do corpúsculo polar dos ovócitos após cultivo de CCOs *in vitro*.**

Todos os grupos são plotados conjuntamente para a correlação entre concentração de 17beta-estradiol (A) ou progesterona (B) e expulsão do corpúsculo polar. A correlação de Pearson identificou significância estatística entre 17beta-estradiol e a expulsão do corpúsculo polar ( $R^2=0,564$ ;  $p=0,0020$ ), enquanto não houve significância em relação à concentração de progesterona ( $R^2=0,009$ ;  $p=0,73$ ).

Com relação a expressão gênica das proteínas da esteroidogênese, tem-se que a adição de FSH ao meio MIV B inibiu significativamente a expressão gênica do *FSHR*, *LHR*, *CYP19A1* e *HSD17B1* (Figura 23 e 24) indicando algum tipo de mecanismo de dessensibilização pela presença de FSH. A única enzima que não sofreu esse efeito foi a *CYP11A1* (Figura 24).

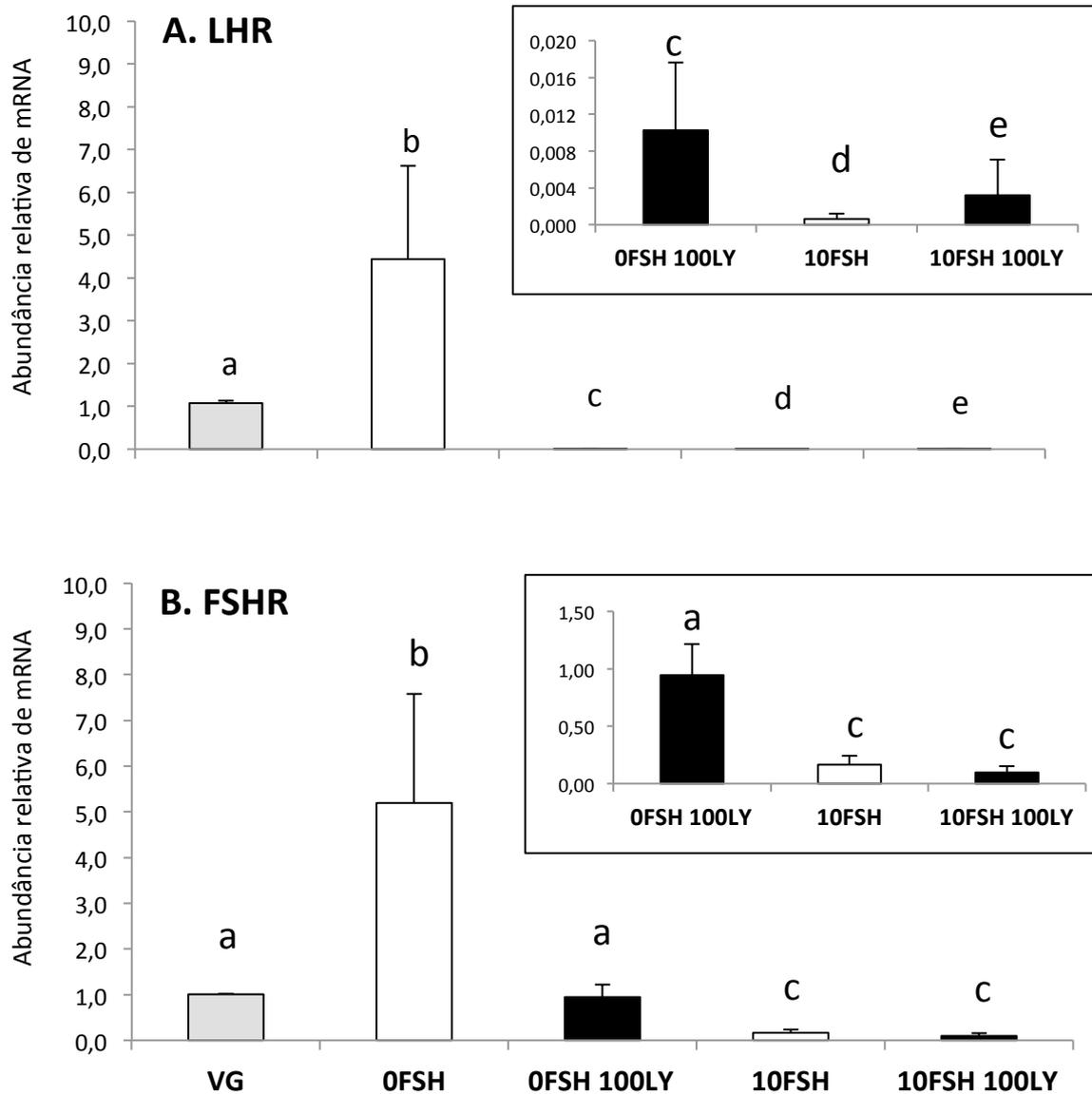
A expressão de receptor de LR (*LHR*) e do receptor de FSH (*FSHR*) é significativamente aumentada no meio 0FSH e nota-se claramente que o meio 0FSH 100LY inibiu a expressão de ambos os receptores (Figura 23). Nota-se também que no meio 10FSH a presença do inibidor LY294002 inibiu a expressão do *FSHR* (Figura 23B) enquanto aumentou do *LHR* (Figura 23A).

Com relação à expressão das enzimas da esteroidogênese, a expressão de *CYP11A1* é estimulada, em relação ao VG, em todos os grupos, com exceção do grupo 0FSH 100LY (Figura 24A). Quando compara-se os quatro meios de MIV testados, observa-se que todos mantiveram constante a expressão de *CYP11A1*, exceto o meio 0FSH 100LY, onde ocorre uma inibição significativa (Figura 24A).

A expressão de *CYP19A1* é estimulada, em relação ao VG, significativamente pelo meio 0FSH e, em menor intensidade, 0FSH 100LY, 10FSH e 10FSH 100LY (Figura 24B). Quando se compara os meios 0FSH e 0FSH 100LY observa-se o efeito inibitório do LY294002 ( $p < 0,05$ ). Não há diferença entre os grupos 0FSH 100LY e 10FSH, porém o meio 10FSH 100LY estimula a expressão de *CYP19A1* em relação aos dois primeiros (Figura 24B).

O meio 0FSH manteve a mesma expressão de *HSD17B1* do grupo VG, porém, houve decaimento da expressão nos meios 0FSH 100LY, 10FSH e 10FSH 100LY (Figura 24C).

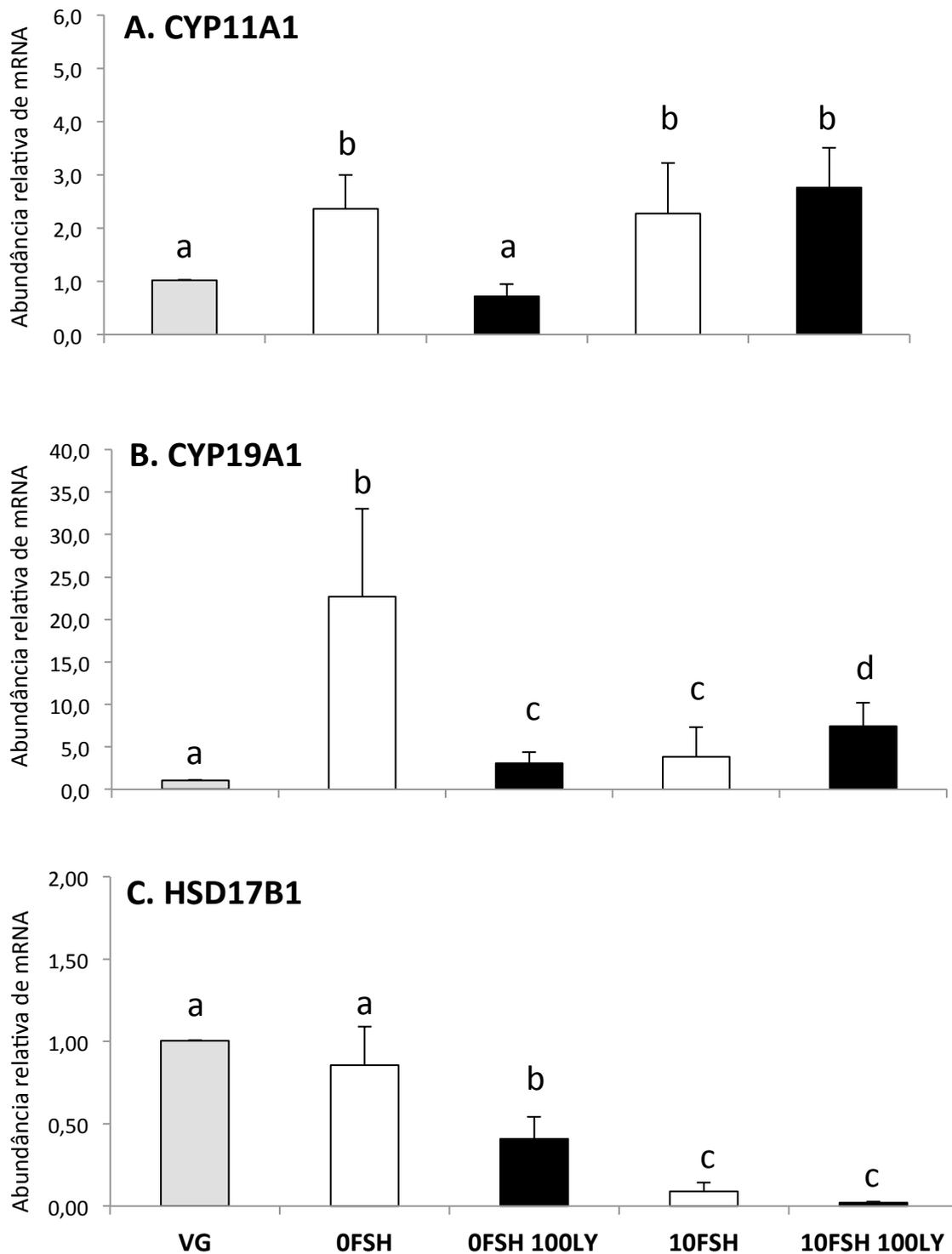
Portanto, a partir dos presentes resultados observa-se que no meio ausente de FSH, o inibidor LY294002 é capaz de inibir a expressão do *LHR*, *FSHR*, *CYP11A1*, *CYP19A1* e *HSD17B1* indicando a relevância fisiológica dessa via no meio MIV B. No meio contendo 10 ng/mL de FSH o inibidor LY294002 teve efeito apenas sobre os genes *LHR* e *CYP19A1*, estimulando a expressão de ambos. Isso indica que o controle da expressão das proteínas da esteroidogênese está sob controle de outra via de sinalização, que não a PI3-K, porém essa mesma via parece exercer papel inibitório sobre a expressão de *LHR* e *CYP19A1* na presença de FSH.



**Figura 23: Expressão gênica dos receptores de LH e FSH de células do *cumulus* provenientes de CCOs cultivados com e sem FSH e sob a presença ou ausência do inibidor da PI-3K (LY294002).**

Letras diferentes indicam diferenças significantes entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Os detalhes da Figura A e B correspondem ao perfil de expressão gênica dos meios 0FSH 100LY, 10FSH e 10FSH 100LY. Todos os valores de expressão são padronizados pelo gene controle, CYC, e o grupo VG é utilizado como calibrador.



**Figura 24: Expressão gênica das enzimas *CYP11A1*, *CYP19A1* e *HSD17B1* de células do *cumulus* provenientes de CCOs cultivados com e sem FSH e sob a presença ou ausência do inibidor da PI-3K (LY294002).**

Letras diferentes indicam diferenças significantes entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Todos os valores de expressão são padronizados pelo gene controle, *CYC*, e o grupo VG é utilizado como calibrador.

## DISCUSSÃO

O MIV B foi capaz de estimular a esteroidogênese e a presença de FSH potencializou esse efeito. Nota-se claramente a relação entre a produção do hormônio esteróide 17 beta-estradiol e a maturação do ovócito aí contido. O meio MIV B estimula a expressão dos genes relativos à esteroidogênese e a produção de hormônios esteróides, 17 beta-estradiol e progesterona. A ação da via PI3-K foi crucial para a síntese desses hormônios, bem como para a expressão gênica das enzimas.

O perfil esteroidogênico se relaciona ao que foi anteriormente descrito por Vasconcelos e colaboradores (2013) utilizando o meio MIV C para cultivar a parede de folículos ovarianos de bovinos. Nesse experimento o efeito do MIV C, sem FSH, foi comparado ao TCM-199, meio contendo alta concentração de FSH e soro, e obteve melhores resultados em termos de esteroidogênese, maiores níveis de expressão gênica de proteínas da via da formação de hormônios esteróides e melhor morfologia da parede do folículo (VASCONCELOS *et al.*, 2013).

Estudos prévios utilizando um meio de composição similar para cultivo de células da granulosa também é capaz de manter a morfologia e a produção de hormônios esteróides de células isoladas de folículos saudáveis e altamente estrogênicos por até 144 horas de cultivo (PICCINATO *et al.*, 2012).

A substituição de BSA por PVA causa, dentro de um menor tempo de cultivo, o aumento na produção de hormônios utilizando o mesmo tipo de cultivo de células da granulosa (MONTREZOR, PICCINATO e SILVA, 2002), o que torna o meio de cultivo definido e potencialmente livre de contaminantes biológicos presentes no soro e na albumina sérica isolada.

O meio MIV C continha outros hormônios e fatores de crescimento comparativamente ao MIV B, porém ambos podem conter o hormônio androstenediona (VASCONCELOS, 2008; VASCONCELOS *et al.*, 2013). Já foi relatado que o cultivo entre 4 e 12 dias de folículos de camundongos nas concentrações  $10^{-5}$ ,  $10^{-9}$  e  $10^{-11}$ M de androstenediona causa diminuição da viabilidade com alteração da morfologia, perda de células do *cumulus* e da granulosa e alteração do formato do ovócito (TARUMI *et al.*, 2012), e estudos prévios no cultivo de CCOs no meio MIV C sem FSH, que continha diversos hormônios, indica perda da viabilidade quando utiliza-se o parâmetro de produção de embriões *in vitro* (GULART, 2009). O meio MIV B, sem androstenediona, indicou

melhores taxas de produção de embriões comparativamente ao MIV C, indicando melhor viabilidade de CCOs (GULART, 2009). Experimentos de fertilização *in vitro* no meio MIV B contendo androstenediona estão em andamento como indicador de viabilidade ovocitária.

Então, pode-se sugerir que os resultados relativos à esteroidogênese na presente tese estão relacionados à presença da androstenediona no meio de cultura, que será utilizado como precursor para a síntese de hormônios esteróides. O meio MIV B torna-se, portanto, uma alternativa viável e barata para a maturação de CCOs *in vitro*.

No presente trabalho os resultados demonstram que há produção de 17 beta-estradiol e progesterona tanto na ausência como na presença de FSH, porém no meio contendo 10 ng/mL de FSH tem-se sempre maiores valores desses hormônios ao final do período de cultivo dos CCOs. Não há diferença entre a razão E2/P4 entre os dois meios, indicando perfis esteroidogênicos similares, o que pode denotar que não há obrigatoriedade de suplementação de FSH no meio de maturação *in vitro* de ovócitos. Em relação à maturação nuclear do ovócito contido nos CCOs cultivados, os valores de 17 beta-estradiol se correlacionam com a expulsão do corpúsculo polar. Os valores de progesterona não possuem tendência a se associarem a essa mesma taxa.

A adição de FSH estimula a produção de hormônios esteróides em células da granulosa e, comparativamente, as células do *cumulus* são um tipo especializado de células da granulosa. Em cultivo de células da granulosa isoladas a suplementação de 1 ou 10 ng/mL de FSH, após 6 dias, os valores de progesterona não foram alterados e os de 17 beta-estradiol aumentaram significativamente na dose de 10 ng/mL de FSH (ZHENG *et al.*, 2008). Artigos prévios demonstram a ação do FSH sobre a produção de progesterona e 17 beta-estradiol (SILVA *et al.*, 2006; GUTIERREZ *et al.*, 1997), sendo que as células do *cumulus* sob ação de 100 – 200 ng/mL de FSH produz mais progesterona que as células da granulosa murais (ARMSTRONG *et al.*, 1996).

Vários efeitos da progesterona e do 17 beta-estradiol já foram apontados para a maturação *in vitro* de CCOs (WANG *et al.*, 2006; FAIR e LONERGAN, 2012; LI, NIWA e HUNTER, 2004). Com relação à influência dos hormônios esteróides sobre a maturação nuclear de ovócitos *in vitro*, Wang e colaboradores (2006) descreveram o uso do AGT que inibe a produção de diversos hormônios esteróides sexuais, a

maturação nuclear dos CCOs (ao redor de 10% na concentração de 10 mM de AGT) e da expansão do *cumulus*, mesmo na presença de FSH. Porém, mesmo na presença de AGT, a suplementação com concentrações crescentes de progesterona ou 17 beta-estradiol, não alterou os parâmetros citados, denotando outros fatores importantes a serem considerados além dos produzidos pelos próprios ovócitos ou que estão presentes no meio (WANG *et al.*, 2006).

Entretanto, salienta-se que a mensuração de 17 beta-estradiol e progesterona do fluido folicular já foram identificadas como bons marcadores para a geração e desenvolvimento embrionário *in vitro* após fertilização, sendo que, *in vivo*, elevados valores de progesterona e baixos de estradiol se correlacionam com boas taxas de embrião *in vitro* (AARDEMA *et al.*, 2013). Porém, salienta-se que os elevados valores de progesterona se relacionam ao efeito do LH *in vivo* sobre o folículo ovariano (AARDEMA *et al.*, 2013), logo, supõe-se melhor viabilidade e competência dos CCOs.

Em relação à via PI3-K, à ação do FSH e a regulação da esteroidogênese de células do *cumulus*, pode-se dizer que são pouco investigadas em termos de CCOs bovinos, porém vários autores já relataram que a alteração da atividade da via PI3-K e da atividade das proteínas da família da MAPK pode alterar o perfil esteroidogênico de células do *cumulus* de CCOs e células de folículo ovariano em cultivo (MANI *et al.*, 2010; EBELING, TÖPFER e MEINECKE, 2011; SU *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2005), sendo que a via da MAPK pode ser controlada também pela via PI3-K e influenciar os resultados encontrados (GUO, 2014).

Sabe-se que o inibidor LY294002 diminui significativamente a produção de progesterona por parte de células do *cumulus* de CCOs (SHIMADA *et al.*, 2003) e de células da granulosa (CHENG *et al.*, 2007) de roedores cultivados *in vitro* na presença de FSH. O uso do inibidor da via MAPK inibiu a produção de progesterona, porém aumentou a produção de estradiol em células do *cumulus* e granulosa em cultivo (EBELING, TÖPFER e MEINECKE, 2011; SU *et al.*, 2006; MOORE, OTSUKA e SHIMASAKI, 2001; YU *et al.*, 2005).

Esses resultados comparativos apontam para uma regulação da produção de hormônios esteróides por parte das vias supracitadas, porém a presente tese indica a diminuição da produção de estradiol, na presença ou ausência de FSH, e aumento de progesterona, na ausência de FSH, pela ação do inibidor LY294002. O FSH é componente essencial nos trabalhos publicados citados (EBELING, TÖPFER e

MEINECKE, 2011; SU *et al.*, 2006; MOORE, OTSUKA e SHIMASAKI, 2001; YU *et al.*, 2005; SHIMADA *et al.*, 2003), sendo que o teste na ausência de FSH é novo em termos de dados científicos para CCOs. Demonstra-se, portanto, que a interação da composição do meio e da via PI3-K trouxe a tona resultados inovadores, pois aqui contextualiza-se a importância do meio de cultivo e da presença de androstenediona no meio MIV B 0FSH.

Em parte, a produção de hormônios esteróides está relacionada à expressão gênica das enzimas de síntese, *CYP11A1*, *CYP19A1* e *HSD17B1*, e dos receptores de gonadotrofinas, *FSHR* e *LHR*. Em termos de expressão gênica, observou-se uma clara diferença entre o cultivo no MIV B com e sem FSH. O meio 0FSH possuiu valores de expressão maiores de todos os genes em questão, enquanto o cultivo por 22–24 horas na presença de FSH provocou a diminuição significativa da expressão, sendo a única exceção o gene da enzima *CYP11A1*.

Já foi demonstrada a ação do FSH sobre a expressão das enzimas *CYP11A1*, *CYP19A1* e *HSD17B1* e dos receptores de gonadotrofinas tanto em CCOs como em células da granulosa (CALDER *et al.*, 2003; SILVA e PRICE, 2002; SAHMI, NICOLA e PRICE, 2006), na presença ou não de outros hormônios.

O *time course* de cultivo de CCOs bovinos *in vitro* demonstra que houve diminuição significativa da expressão do receptor de FSH, porém os valores de expressão do receptor após 3–6 horas de cultivo eram similares aos valores do tempo zero. Já o *LHR* tende a aumentar após o mesmo período de cultivo (CALDER *et al.*, 2003; SALHAB *et al.*, 2011).

A expressão da *CYP11A1* e *CYP19A1* também decai com o tempo de cultivo (SALHAB *et al.*, 2011). Já o perfil de expressão da *HSD17B1* é pouco ou nada explorado na literatura referente a CCOs bovinos. Deve-se salientar que o perfil de expressão será alterado pela composição do meio de cultura do CCO e o tipo de hormônio suplementado *in vitro*.

Os resultados de expressão gênica encontrados na presença de FSH no meio de cultivo *in vitro* pode ser explicado pela *down regulation* dos receptores de FSH (HOUDE *et al.*, 1994), em virtude da exposição por longos períodos a concentrações constantes de hormônio, ao contrário do que se observa *in vivo*, quando as gonadotrofinas tem perfil de secreção pulsátil, ou pela estabilidade do RNA ao longo do período de cultivo (SAHMI, NICOLA e PRICE, 2006). Em célula da granulosa de

bovino cultivadas *in vitro* a meia-vida do mRNA da *CYP19A1* é ao redor de 3 horas e da *CYP11A1* e *HSD17B1* é de 12 horas (SAHMI, NICOLA e PRICE, 2006).

Deve-se salientar que o perfil de expressão gênica das enzimas *CYP11A1*, *CYP19A1* e *HSD17B1* são diferentes quando compara-se células do *cumulus* e da granulosa em cultivo, pois nas células da granulosa há aumento da expressão dessas enzimas após suplementação com 10 ng/mL de FSH (ZHENG *et al.*, 2008), enquanto em células do *cumulus* há decaimento da expressão (SALHAB *et al.*, 2011).

Observou-se também uma clara diferença entre a relevância da via na presença e na ausência de FSH nos nossos resultados. Na ausência dessa gonadotrofina, a inibição da via PI3-K teve forte ação sobre a expressão de todos os genes, indicando que componentes do meio, produzidos pelo próprio ovócito e/ou a androstenediona podem ser responsáveis pelo perfil apresentado.

No meio com FSH, a inibição da via PI3-K causou aumento da expressão do *LHR* e da *CYP19A1*, indicando que essa via, quando ativa, suprime a expressão de ambos os genes. Deve-se lembrar que nos experimentos de *time course* no cultivo de CCOs *in vitro*, os valores de expressão do gene *LHR* e *CYP19A1* decaem significativamente após 22 horas de cultivo (CALDER *et al.*, 2003; SALHAB *et al.*, 2011). Logo, a ação da via PI3-K também pode ser tempo-dependente, o que não foi objeto de teste da presente tese.

Alguns dados prévios corroboram os presentes resultados. A inibição da via PI3-K pelo uso da wortamina, por exemplo, não modifica a presença da proteína *CYP11A1* em células da granulosa *in vitro* de ratos (CHENG *et al.*, 2007).

Em CCOs de camundongo a inibição da via MAPK (controlada pela PI3-K) inibiu a transcrição gênica da *CYP11A1* e estimulou a enzima *CYP19A1* (SU *et al.*, 2006). Em células do *cumulus* do ovário de rato, a inibição da MAPK não causou efeito sobre a *CYP11A1*, porém estimulou a expressão da *CYP19A1* (MOORE, OTSUKA e SHIMASAKI, 2001). Yu e colaboradores (2005) indicaram que a inibição da MAPK inibe a expressão de *CYP19A1* em células da granulosa de ratos em cultivo. Em CCOs suínos os valores de *CYP11A1* foram os mesmos ao longo do tempo de cultivo e a expressão de *CYP19A1* aumentou independentemente da inibição da MAPK (EBELING, TÖPFER e MEINECKE, 2011).

Logo, tem-se uma divergência de resultados, porém alguns dados indicam que a via MAPK suprime a expressão de *CYP19A1* e não altera a *CYP11A1*,

portanto corrobora com os resultados aqui encontrados no meio 10FSH. Porém, o perfil da expressão do *FSHR*, *LHR* e *HSD17B1* são pouco explorados na literatura em células do *cumulus* em relação à via PI3-K, logo a presente tese descreve resultados muito relevantes.

Interações com outros hormônios como IGF-1, além do FSH, também são responsáveis pelo perfil esteroidogênico de células da granulosa *in vitro*, apontando assim, futuras perspectivas para o estudo da via PI3-K/Akt e MAPK em CCOs bovinos (MANI *et al.*, 2010).

Conclui-se que os dados provenientes da esteroidogênese das células do *cumulus* de CCOs bovinos indicam efeito benéfico do meio patenteado sobre o perfil *in vitro* das células e relaciona-se com a maturação nuclear do ovócito. Há, potencialmente, chances de aumentar a competência do ovócito em gerar embriões viáveis, porém mais estudos são necessários sobre o controle da expressão gênica das proteínas-chave da esteroidogênese. Novos experimentos também são requeridos para determinar os efeitos do 17 beta-estradiol sobre a maturação do CCO bovino em cultivo.

## **CAPÍTULO III**

### **EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS-CHAVE DA NUTRIÇÃO DO CCO EM CÉLULAS DO *CUMULUS***

**Ação da via PI3-K em meio definido patentado suplementado ou não com FSH**

## INTRODUÇÃO

Nos ovócitos, as vias anabólicas, como a síntese de proteínas, de DNA e RNA e a síntese de reservas energéticas na forma de triglicerídeos e glicogênio, estão ativas para suprimento não apenas das necessidades dessa célula como também do embrião no período pré-implantação. Nas fases iniciais de clivagem a transcrição dos genes do embrião é limitada e há dependência do ambiente *in vivo* ou *in vitro* e das reservas energéticas que são acumuladas durante o período de maturação do ovócito (GARDNER *et al.*, 2001; BRINSTER, 1974; FERGUSON & LEESE, 1999).

Todas as células precisam de substratos para síntese de adenosina trifosfato (ATP) e de moléculas celulares fundamentais à manutenção da vida. A geração de energia pode ocorrer de duas formas: via glicolítica (anaeróbia) e via oxidativa (aeróbia). A via glicolítica ocorre no citosol, não necessita de oxigênio e culmina com a produção de lactato e duas moléculas de ATP. Já a oxidativa (aeróbia) ocorre dentro da mitocôndria, precisa de oxigênio e promove a oxidação completa do piruvato a dióxido de carbono e água com a formação de 30 a 32 moléculas de ATP através do ciclo do ácido cítrico e da fosforilação oxidativa. O piruvato provém da metabolização da glicose pela via glicolítica e é o substrato essencial para o ciclo de Krebs. Logo, são duas vias metabólicas interdependentes (NELSON e COX, 2005).

A atividade metabólica ovocitária, muito dependente de glicose, também está correlacionada com a competência do ovócito, pois o nível dos substratos energéticos afeta profundamente a maturação nuclear e citoplasmática. Ao aumentar a concentração de glicose no meio de cultivo, por exemplo, induz-se maior taxa de maturação nuclear e citoplasmática (SUTTON-McDOWALL, GILCHRIST e THOMPSON, 2010).

As células do *cumulus* e o ovócito (CCO) constituem uma unidade metabólica bidirecional através de sinalização parácrina e/ou através de junções comunicantes, sendo que todo esse aparato celular é fundamental para a viabilidade ovocitária. Boa parte da glicose captada pelo CCO é, na realidade, captada pelas células do *cumulus*, nas quais esta pode seguir várias vias: via glicolítica, ciclo pentose fosfato, via das hexosaminas, via oxidativa, entre outras, podendo transmitir diferentes metabólitos da glicose para o ovócito (SUTTON-McDOWALL, GILCHRIST e THOMPSON, 2010) (Figura 25).

Uma das confirmações experimentais para a teoria do metabolismo integrado do CCO deve-se ao fato de que a atividade da enzima da via glicolítica fosfofrutocinase é baixa em ovócitos e elevada em células do *cumulus*, indicando alta taxa de metabolismo glicolítico nas células do *cumulus* (CETICA *et al.*, 2002). Deve-se lembrar que nesse contexto, as células do *cumulus* consomem 23 vezes mais glicose do que o ovócito e este, por sua vez, consome 3 vezes mais oxigênio do que as células do *cumulus* (THOMPSON, 2006), demonstrando que boa parte do metabolismo aeróbio é realizado pelas enzimas ovocitárias.

A captação de glicose pelos CCOs se dá através do GLUT1 e do GLUT4, sendo que este último é o transportador facilitado dependente da ligação da insulina ao seu receptor e da via PI3-K (SALTIEL & KAHN, 2001). O GLUT4 está presente, inicialmente, apenas nas células do *cumulus* e também responde à via PI3-K e ao FSH, elevando a captação de glicose dos CCOs (ROBERTS *et al.*, 2004; SUTTON-McDOWALL, GILCHRIST e THOMPSON, 2010).

A via de sinalização da PI3-K está fortemente associada ao metabolismo, crescimento e sobrevivência celular (ENGELMAN, LUO e CANTLEY, 2006), além de estimular a transcrição de uma série de genes das enzimas da glicólise (hexocinase, fosfofrutocinase e piruvato cinase), do ciclo de Krebs (piruvato desidrogenase) e da síntese de ácidos graxos (acetil CoA carboxilase e ácido graxo sintase) (SALTIEL & KAHN, 2001).

Assim, para aprofundar os conhecimentos a respeito da influência do metabolismo celular sobre a MIV é fundamental avaliar a transcrição de genes do metabolismo intermediário de células do *cumulus*. Além disso, há pouco ou nenhum relato na literatura atual a respeito da expressão gênica dessas enzimas em CCOs bovinos, bem como das influências do FSH e da via PI3-K.

Alguns pontos chave são importantes para a utilização da glicose: a captação através de transportadores de membrana e sua metabolização intracelular. As vias metabólicas preferenciais de metabolização serão diferentes em cada tecido e situação fisiológica.

Os transportadores de glicose GLUT1 e GLUT4 estão presentes em células foliculares (NISHIMOTO *et al.*, 2006), incluindo o ovócito e as *cumulus* (HAN *et al.*, 2012). A presença de GLUT4 nas células do *cumulus* já foi relacionado à ação do FSH e da via PI3-K (ROBERTS *et al.*, 2004), enquanto o GLUT1 pode estar sob

controle da progesterona em células endometriais em cultivo (CARRUTHERS *et al.*, 2009; FROLOVA *et al.*, 2009).

Em relação às enzimas do metabolismo intermediário, tem-se duas enzimas-chave importantes que são a piruvato desidrogenase (PDH) e a glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (Figura 25).

O CCO possui metabolismo predominantemente aeróbico e há envolvimento de enzimas do ciclo de Krebs e rotas oxidativas em seu desenvolvimento e amadurecimento (CETICA *et al.*, 2003; SUTTON-McDOWALL, GILCHRIST e THOMPSON, 2010; THOMPSON, 2006). O complexo multienzimático PDH converte piruvato em acetil-CoA na matriz da mitocôndria e é composta de 7 subunidades, porém pouco se sabe sobre o perfil de expressão gênica dessa enzima em CCOs (NELSON e COX, 2005; TAKAKUBO e DAHL, 1992). O estudo da expressão da enzima PDH não foi objeto de estudos prévios, fazendo-se necessário essa investigação.

As células do *cumulus* e ovócito possuem elevada atividade da enzima glicose-6 fosfato desidrogenase (G6PDH) relacionada à detoxificação de radicais livres e formação de purinas (adenina e guanina) essenciais à síntese de DNA e replicação celular (SUTTON-McDOWALL, GILCHRIST e THOMPSON, 2010). A metabolização da glicose pela via pentose fosfato leva à produção de purinas que, ao serem transportadas ao ovócito através das junções comunicantes, levaria à retomada e finalização da meiose (SUTTON-McDOWALL, GILCHRIST e THOMPSON, 2010). Menos de 3% da glicose entra nessa via no ovócito (URNER e SAKKAS, 1999).

A expressão da enzima G6PDH pode ser regulada pela concentração de oxigênio no cultivo de CCOs (KANG *et al.*, 2012) e sua atividade mais baixa em ovócitos bovinos, inferida pela técnica de azul de cresil, está relacionada à maiores taxas de ovócitos que alcançam a metáfase II, ou seja, a maturação nuclear, e de geração de blastocistos *in vitro* (ALM *et al.*, 2005), sugerindo envolvimento na competência ovocitária que repercute sobre a viabilidade embrionária.

Uma parte dessa glicose também é usada para a síntese de ácido hialurônico, que corresponde a uma das moléculas mais importantes para a expansão das células do *cumulus* (via das hexosaminas) (SUTTON-McDOWALL, GILCHRIST e THOMPSON, 2010; THOMPSON, 2006; SUTTON-McDOWALL, GILCHRIST e THOMPSON, 2004). A via das hexosaminas corresponde ao uso de 25% da glicose

pelos CCOs e isso explica a elevada taxa de captação de glicose pelas células do *cumulus* durante a maturação nuclear (THOMPSON, 2006).

Do ponto de vista fisiológico, as gonadotrofinas, hormônios que agem sobre os ovários durante a fase de maturação e ovulação, atuam sobre o folículo levando à maturação dos ovócitos, desenvolvimento das células de sustentação (células da granulosa e da teca) e alterando o perfil metabólico dos CCOs. O LH aumenta o consumo de oxigênio de ovócitos isolados e a produção de lactato, sugerindo aumento da atividade nas vias aeróbia e anaeróbia *in vitro* (WILDING *et al.*, 2005).

O FSH regula o crescimento do folículo e a expansão do *cumulus* e, além disso, a suplementação com um análogo inativo de glicose, a 2-deoxi-glicose (2-DG), suprimiu a expansão das células do *cumulus* mediada pelo FSH além de inibir a maturação nuclear do ovócito (HAN *et al.*, 2012), indicando a relevância do FSH na regulação do metabolismo da glicose. *In vitro*, o FSH aumenta a captação de glicose e a produção de piruvato e lactato em CCOs cujos ovócitos estão amadurecendo até a fase de metáfase II (ROBERTS *et al.*, 2004). Os ovócitos que não completaram a maturação nuclear captam menos glicose, produzem menos piruvato e lactato, não sofrendo, portanto, qualquer alteração metabólica mediada pelo FSH (ROBERTS *et al.*, 2004).

O inibidor da PI3-K (LY294002) diminui a captação de glicose estimulada por FSH em CCO maduros (ROBERTS *et al.*, 2004), demonstrando a relevância dessa via sobre a taxa metabólica. Uma das explicações deve-se ao fato do FSH aumentar a metabolização da glicose e aumentar a atividade da enzima hexocinase (primeira enzima da rota glicolítica), sendo esse um dos possíveis mecanismos pelos quais o FSH aumenta a taxa de maturação nuclear *in vitro* (ROBERTS *et al.*, 2004; DOWNS *et al.*, 1996; HAN *et al.*, 2012). Portanto, as ações metabólicas do FSH podem ser, ao menos em parte, associadas à ação da PI3-K.

Em termos de tráfego de componentes na célula, há o transporte de componentes, como proteínas e outros metabólitos, dentro de vesículas. O transporte de vesícula pressupõe contato entre membranas e envolve o citoesqueleto da célula. Proteínas específicas que encontram-se nessas vesículas e compartimentos celulares permitem o reconhecimento entre membranas, levando, por exemplo, a exocitose ou endocitose (ZYLBERSZTEJN e GALLI, 2011; WU *et al.*, 2014). A endocitose, por exemplo, pode ser usada como forma de nutrição de

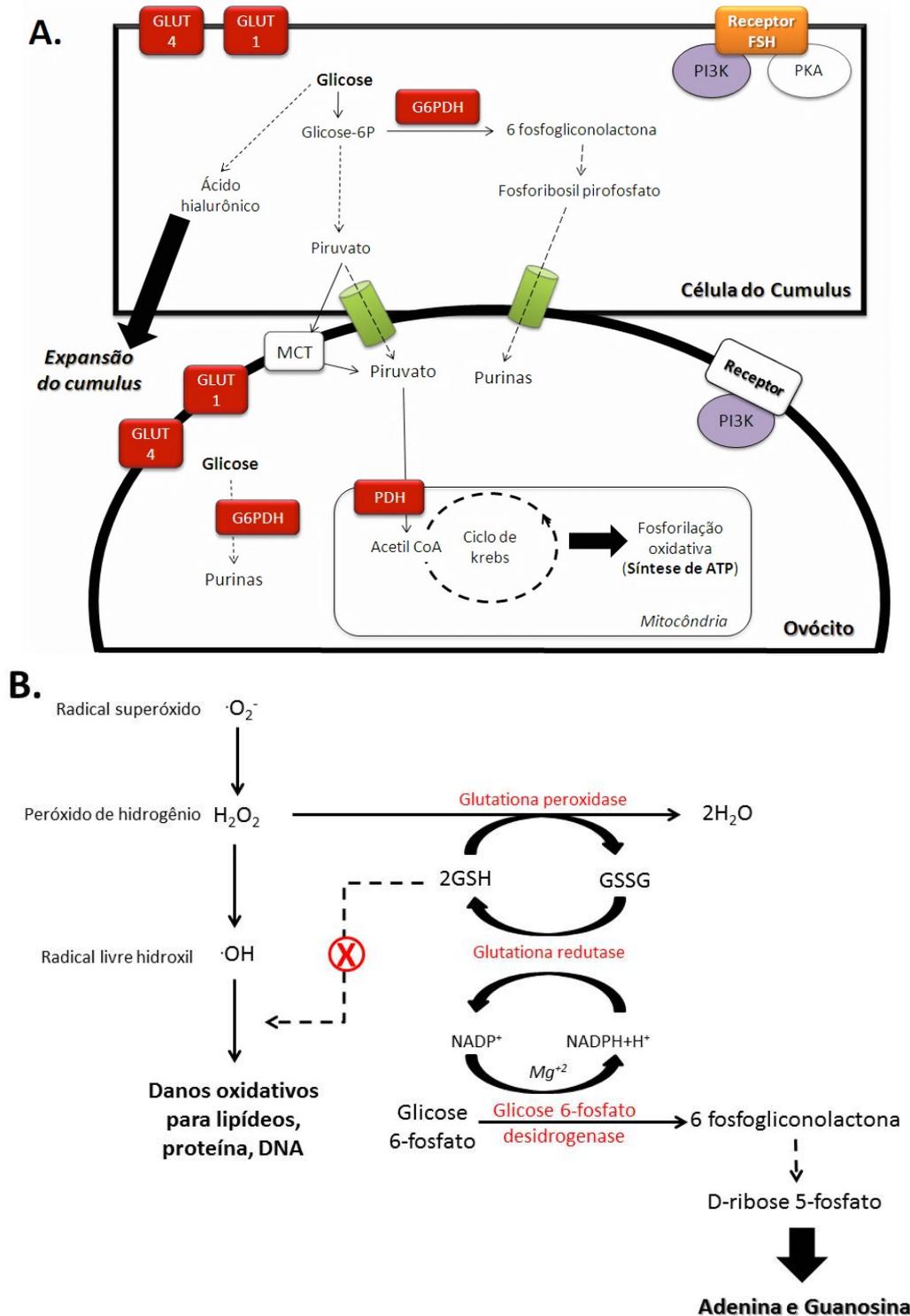
blastocistos *in vitro*, por meio da endocitose de albumina sérica (THOMPSON *et al.*, 1998).

Há dois tipos de proteínas de tráfego de membranas: as v-SNARES (proteínas de membrana associadas à vesículas, também chamadas de VAMPs) e as t-SNARES (proteínas-alvo), localizadas no compartimento celular receptor (ZYLBERSZTEJN e GALLI, 2011). A SNAP-25 é um tipo de t-SNARE envolvida no processo de exocitose e endocitose (KASAI, TAKAHASHI e TOKUMARU, 2012; WU *et al.*, 2014).

Ovócitos, células foliculares e lúteas de humanos e de roedores apresentam a proteína SNAP25 (GROSSE *et al.*, 2000). As células da granulosa possuem imunomarcacão mais pronunciada em folículos em crescimento. Foi identificada SNAP25 também em células da teca de roedores, mas não em humanos (GROSSE *et al.*, 2000).

A expressão da SNAP25 é controlada pelo LH/hCG, FSH, estrogênio e progesterona (GROSSE *et al.*, 2000; SHIMADA *et al.* 2007; JACOBSSON *et al.*, 1998). Um estudo em roedores usando administração de hCG *in vivo* demonstra que a expressão e a presença da proteína SNAP25 é tempo dependente, com pico entre 8 e 12 horas de cultivo para ambos os parâmetros (SHIMADA *et al.* 2007).

A expressão de SNAP25 já foi relacionada à via PKA, envolvendo o cAMP, e há uma série de evidências sobre a relação da via PI3-K com o processo de tráfego de membranas e a ação da SNAP25 em outros modelos experimentais (OSBORNE, WEN e MEUNIER, 2006).



**Figura 25: Metabolismo intermediário da glicose e a integração entre as células do cumulus e ovócito.**

**Figura 4A:** As células do cumulus possuem as maiores taxas de uso de glicose e, sob ação de vários hormônios (entre eles está o FSH), metaboliza a glicose em diversas vias metabólicas, porém apenas três possibilidades são ilustradas. A glicose, captada pelos transportadores de glicose GLUT1 e GLUT4, entram na célula e podem ser metabolizadas a piruvato através da via glicolítica (ocorre tanto na célula do cumulus quanto no ovócito, mas

a figura ilustra apenas a célula do *cumulus*). O piruvato produzido na célula do *cumulus* pode ser consumido pela célula ou transportado para o ovócito para geração de ATP através de via oxidativa. Uma das enzimas-chave da via oxidativa é o complexo piruvato desidrogenase (PDH). PDH é encontrada tanto nas células do *cumulus* quanto no ovócito, mas na figura é mostrada apenas no ovócito.

A glicose também pode ser captada diretamente pelo ovócito através dos transportadores de glicose, porém não há evidências da presença de GLUT4 no ovócito.

A glicose pode ser usada pelas células do *cumulus* para a síntese de ácido hialurônico, através da via das hexosaminas, e é um componente essencial da matriz extracelular e responsáveis pela expansão das células do *cumulus*.

A via pentose fosfato metaboliza glicose, cuja enzima-chave é a glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PDH), é demonstrada na figura tanto em ovócitos quanto em células do *cumulus para síntese de purinas que controlam a meiose*.

**Figura 4B:** Via metabólica ligada a glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PDH). Na figura é ilustrada as principais etapas do metabolismo celular nas quais a G6PDH está envolvida. A primeira etapa corresponde a formação de D-ribose 5 fosfato através da via pentose fosfato essencial para síntese de purinas (adenina e guanina) do DNA e RNA. Na segunda etapa demonstra-se o efeito da G6PDH na geração de NADPH que é obrigatoriamente usado para manter o estado oxirredutivo da célula e permitir a regeneração de glutathiona reduzida (GSH) para detoxificação de radicais livres. A GSSG corresponde a glutathiona oxidada.

Modificado de Roberts e colaboradores, 2004; Nelson e Cox, 2005 e Sutton-McDowall, Gilchrist e Thompson, 2010.

Portanto, observa-se que a nutrição do CCO influencia o ovócito e está relacionado à maturação nuclear e citoplasmática. Logo, tem-se como objeto de estudo pontos-chave da nutrição do complexo cumulus-ovócito por meio de transportadores de glicose, enzimas metabólicas e proteínas de endocitose-exocitose em células do *cumulus* de CCOs cultivados em meio patentado com e sem FSH. Utilizou-se o inibidor da via PI3-K para identificar uma possível ação dessa via de sinalização sobre a expressão dos genes-alvo, o que nunca foi descrito na literatura.

## RESULTADOS

Com relação a expressão gênica no meio patenteado, a adição de FSH ao meio MIV B não causou diferença significativa na expressão de GLUT1 e PDH comparado ao meio 0FSH (Figura 26A e 27B). A presença de FSH inibiu a expressão de GLUT4 e G6PDH (Figura 26B e 27A).

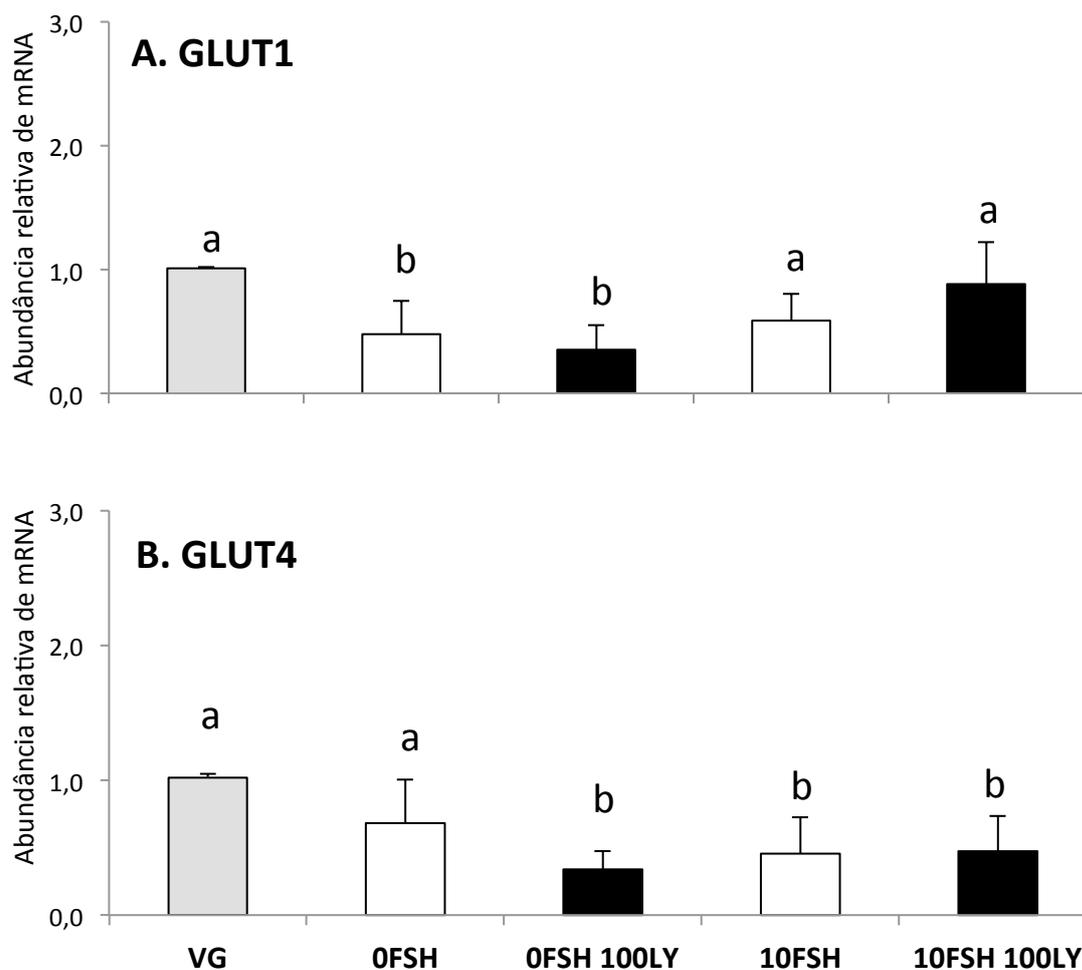
Em termos, de ação da via PI3-K, o cultivo no meio 0FSH e 0FSH 100LY diminui significativamente a expressão de GLUT1, entretanto observa-se que o cultivo no meio 10FSH e 10FSH 100LY iguala os valores de expressão em relação ao VG (Figura 26A). Dentre os quatro meios testados, o meio 0FSH 100LY obteve menor nível de expressão de GLUT1 (Figura 26A).

O GLUT4 mantém sua expressão quando cultivado no meio 0FSH, em relação ao VG, porém todos os outros meios de cultivo causam a inibição de sua expressão (Figura 26B). A ação do inibidor LY294002 é observado no meio sem FSH.

Com relação à expressão do gene G6PDH, o meio 0FSH obteve níveis de expressão maiores que o meio 0FSH 100LY, que por sua vez teve níveis comparados ao grupo 10FSH (Figura 27A). O meio 10FSH 100LY causou os menores níveis de expressão de G6PDH quando comparado a todos os outros meios (Figura 27A).

A enzima PDH tem sua expressão diminuída por todos os meios de cultura em comparação ao VG (Figura 27B), não havendo diferença de expressão gênica nas células do *cumulus* de CCOs nos meios testados.

Ao plotar os valores de expulsão do corpúsculo polar e da expressão de GLUT1, GLUT4 ou G6PDH, observa-se que o padrão de expressão de G6PDH é o único que aproxima-se do perfil de maturação nuclear ovocitária (taxa de expulsão do corpúsculo polar) nos grupos estudados (Figura 28).



**Figura 26: Expressão gênica dos transportadores de glicose *GLUT1* e *GLUT4* de células do *cumulus* provenientes de CCOs cultivados com e sem FSH e sob a presença ou ausência do inibidor da PI-3K (LY294002).**

**Legenda a Figura A:**

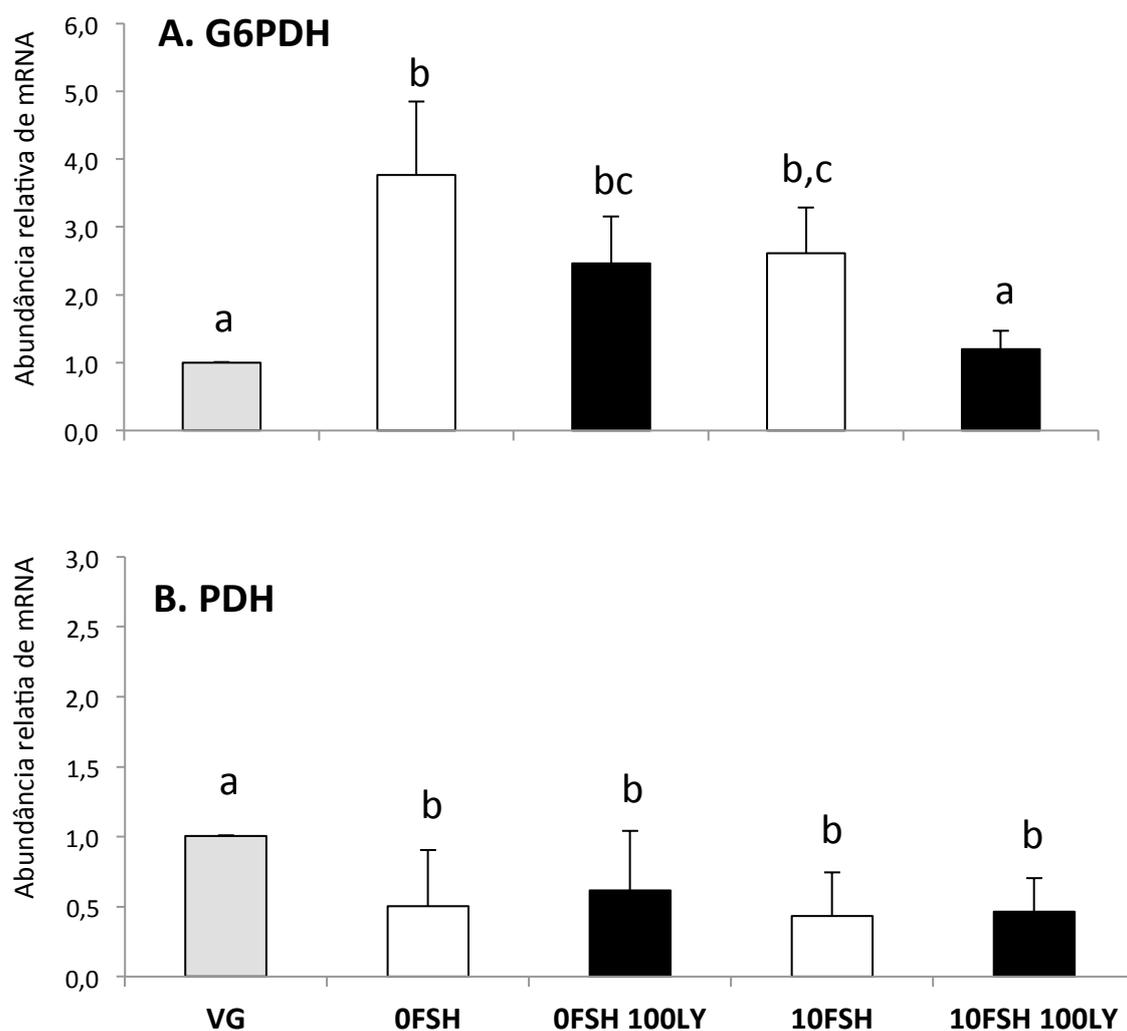
Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Não há diferença estatística entre os grupos 0FSH, 10FSH e 10FSH 100LY ( $p > 0,05$ ).

**Legenda a Figura B:**

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

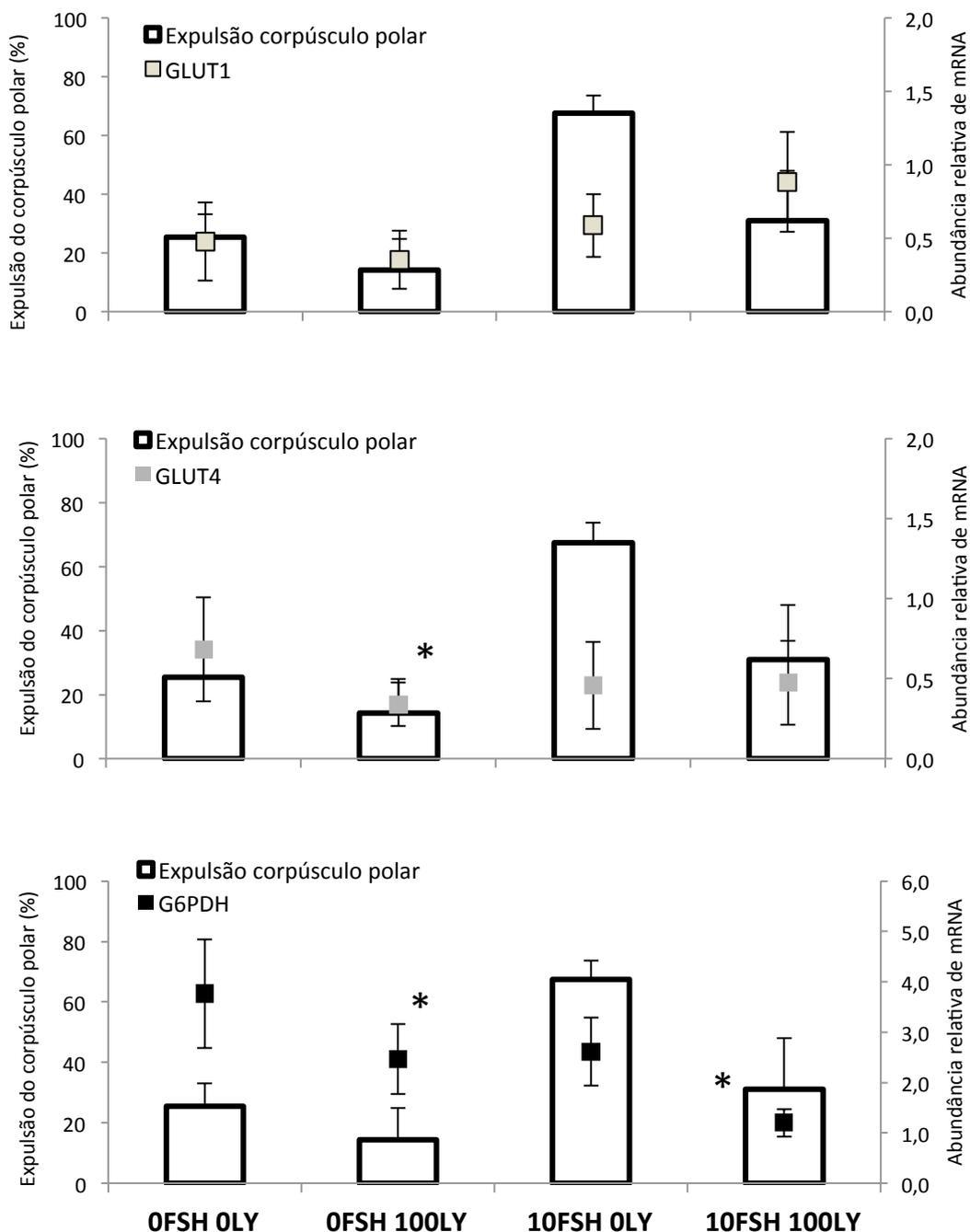
Todos os valores de expressão são padronizados pelo gene controle, *CYC*, e o grupo VG é utilizado como calibrador.



**Figura 27: Expressão gênica das enzimas *G6PDH* e *PDH* de células do *cumulus* provenientes de CCOs cultivados com e sem FSH e sob a presença ou ausência do inibidor da PI-3K (LY294002).**

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Todos os valores de expressão são padronizados pelo gene controle, *CYC*, e o grupo VG é utilizado como calibrador.

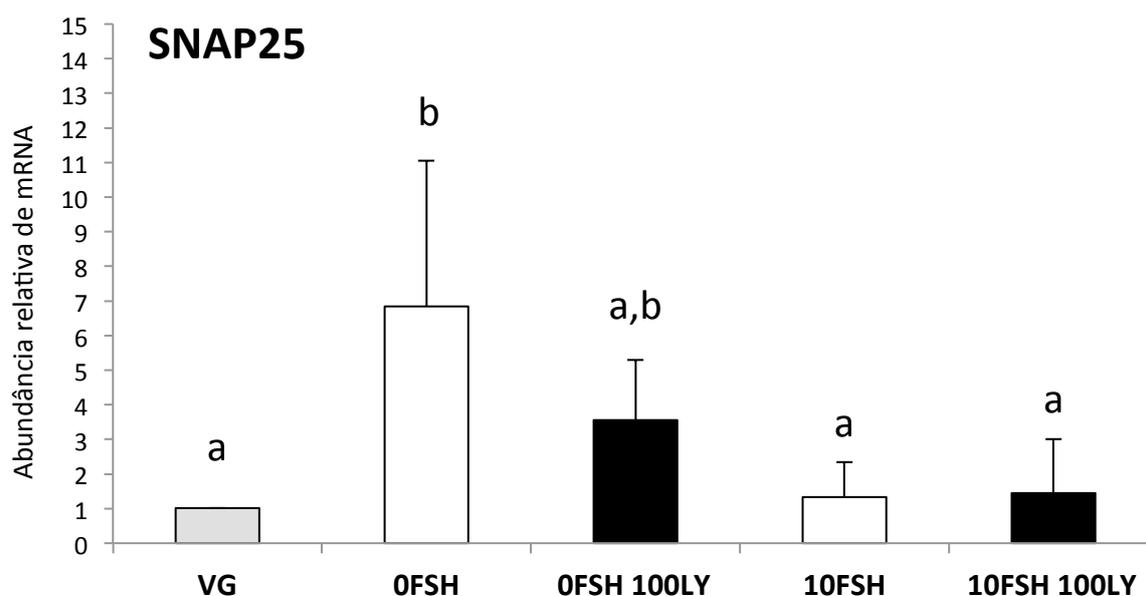


**Figura 28:** Perfil da taxa de expulsão do corpúsculo em comparação à expressão gênica do *GLUT1*, *GLUT4* e *G6PDH* de células do *cumulus* de CCOs cultivados com e sem FSH e sob a presença ou ausência do inibidor da PI-3K (LY294002).

\* Indica diferença entre os meios sem e com LY294002 (expressão gênica)

Com relação a proteína de endocitose e exocitose SNAP25, o meio 0FSH estimula e a adição de FSH inibe sua expressão (Figura 29). Os valores de expressão no meio 10FSH se equiparam aos valores do VG.

Com relação à via PI3-K, não se observa efeito tanto no meio com quanto no meio sem FSH (Figura 29).



**Figura 29: Expressão gênica relativas à proteína SNAP25 em células do cumulus provenientes de CCOs cultivados com e sem FSH e sob a presença ou ausência do inibidor da PI-3K (LY294002).**

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Todos os valores de expressão são padronizados pelo gene controle, CYC, e o grupo VG é utilizado como calibrador.

## DISCUSSÃO

Os presentes resultados apontam para a atuação do FSH sobre o controle da expressão gênica do GLUT1, GLUT4, G6PDH e SNAP25 e a relevância da via PI3-K para o GLUT4 e G6PDH em células do *cumulus* de CCOs bovinos.

O metabolismo da glicose em CCOs é de extrema importância, pois é o substrato energético necessário para diversas funções fisiológicas relacionadas ao amadurecimento do ovócito *in vitro* e *in vivo*. Dentre elas, pode-se destacar a necessidade de glicose para sintetizar os componentes extracelulares responsáveis pela expansão das células do *cumulus*; para a glicólise e ciclo de Krebs, necessários para a geração de ATP; e para a síntese de purinas que controlam a maturação nuclear (SUTTON-McDOWALL, GILCHRIST e THOMPSON, 2010). Os aspectos metabólicos do ovócito pode influenciar a geração de embriões *in vitro* (THOMPSON, 2006).

O ovócito por si só tem baixa capacidade de metabolizar glicose por apresentar baixa atividade da enzima fosfofrutocinase (CETICA *et al.*, 2002), além de baixa atividade da enzima do ciclo de Krebs isocitrato desidrogenase (CETICA *et al.*, 2003), assim é extremamente dependente da atividade das enzimas das células do *cumulus*. Evidências mostram que as células do *cumulus* são capazes de captar e metabolizar a glicose e transportar seus metabólitos ao ovócito, constituindo assim uma unidade metabólica interdependente, como já demonstrado por Sutton-McDowall, Gilchrist e Thompson (2010).

Assim, observa-se a grande importância de avaliar o perfil de expressão gênica de enzimas-chave, de transportadores de glicose e de proteínas relacionadas a endocitose/exocitose nas células do *cumulus*, visto que são aspectos pouco explorados. Soma-se a esses objetivos o fato de ser a primeira descrição metabólica de CCOs cultivados no meio MIV B com ou sem FSH.

No presente trabalho os valores de expressão gênica de GLUT1 foram afetados pelo meio sem FSH, decaindo significativamente. O GLUT4 tem seus valores aumentados no meio patenteado 0FSH e o acréscimo de FSH não consegue manter esses valores próximos aos obtidos no meio sem FSH, decaindo significativamente.

Com relação à ação da via PI3-K sobre esses genes, o GLUT1 não sofre a ação do inibidor LY294002. No meio 0FSH o GLUT4 decai em níveis de expressão pela ação do LY294002 e no meio 10FSH não se observa o efeito do LY294002.

Os transportadores de glicose GLUT1 e GLUT4 já foram descritos em folículos ovarianos, corpo lúteo (NISHIMOTO *et al.*, 2006) e nas células do *cumulus* (HAN *et al.*, 2012). A presença de GLUT4 nas células do *cumulus* já foi relacionada à ação do FSH e da via PI3-K em CCOs de camundongo, bem como a interrelação de ambos com a captação e uso da glicose como substrato energético (ROBERTS *et al.*, 2004). O uso do inibidor LY294002 também já foi testado em células do *cumulus* de camundongo e humanos na presença de insulina e há diminuição da captação de glicose por meio da inativação da via PI3-K/Akt (PURCELL, CHI e MOLEY, 2012).

O consumo de glicose em CCOs de camundongo é estimulado pelo FSH de forma dose-dependente *in vitro* e o LY294002 inibe esse consumo (ROBERTS *et al.*, 2004). Com relação ao FSH, já foi demonstrado em CCOs de camundongo que a suplementação com um análogo inativo de glicose, 2-DG, suprimiu a expansão das células do *cumulus* mediada pelo FSH além de inibir a maturação nuclear do ovócito (HAN *et al.*, 2012), demonstrando que um dos efeitos do FSH sobre a maturação ovocitária se dá pelo metabolismo intermediário da glicose.

Em termos de regulação, a expressão gênica do GLUT1 é controlada de forma diferente em cada tecido (CARRUTHERS *et al.*, 2009). As células endometriais, por exemplo, sob ação da progesterona aumentam a expressão enquanto a exposição ao estradiol ou progesterona e estradiol diminuem a expressão de GLUT1 (FROLOVA *et al.*, 2009).

Em CCOs de camundongo, a suplementação de glicose no meio de cultivo aumenta a presença da proteína (HAN *et al.*, 2012) e em CCOs suínos a concentração de 5% de oxigênio aumenta a expressão de GLUT1 (KANG *et al.*, 2012). Na presente tese o GLUT1 foi estimulado pela ação do FSH sobre as células do *cumulus*, porém não há controle por parte da via PI3-K.

O gene referente ao transportador GLUT4 tem sua expressão gênica bastante estudada, por exemplo, em tecido adiposo e músculo (IM *et al.*, 2007), e a ligação da via PI3-K com o GLUT4 tanto em termos de expressão como de translocação para a membrana é bem conhecida (McGOWAN, LONG e PEKALA, 1995; GUO, 2014).

Nossos resultados demonstram a regulação do GLUT4 no meio 0FSH pela via PI3-K. Porém, no meio 10FSH os valores de expressão são mais baixos e não há alteração do padrão de expressão gênica pelo inibidor LY294002, indicando um controle diferencial entre o meio sem e com FSH. Possivelmente outras vias de

sinalização estejam envolvidas no presente resultado ou o efeito da via PI3-K no meio contendo FSH seja tempo-dependente. Logo, após 22 horas de cultivo pode-se ter atingido um platô de resposta fisiológica, onde não se encontrará nenhuma alteração.

Estudos envolvendo Dibutilil cAMP, um análogo do cAMP, demonstra a inibição sobre o transporte de glicose mediado por GLUT4, porém não afeta o mediado por GLUT1, em células ovarianas, o que também pode explicar a regulação diferente do GLUT4 no meio ausente e presente de FSH (PIPER *et al.*, 1993), já que o FSH tem ação sobre vias ligadas à síntese intracelular de cAMP (SIRARD, DESROSIER e ASSIDI, 2007).

Em relação às enzimas do metabolismo intermediário, a enzima-chave da via oxidativa de geração de ATP, piruvato desidrogenase (PDH), e a enzima-chave do ciclo das pentoses, glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) foram investigadas nas células do *cumulus* de CCOs. Após o cultivo a expressão de PDH diminuiu e os tratamentos não modificaram seu padrão de expressão. Já a enzima G6PDH foi aumentada pela ação do MIV B 0FSH e o inibidor LY294002 diminuiu os valores de expressão. No meio 10FSH foram obtidos valores maiores de expressão de G6PDH do que no meio 10FSH 100LY indicando ação da via PI3-K, porém os valores de expressão no meio 10FSH são sempre inferiores aos meios 0FSH.

A expressão da enzima G6PDH pode ser regulada pela concentração de oxigênio no cultivo de CCOs (KANG *et al.*, 2012) e sua atividade mais baixa em ovócitos bovinos, inferida pela técnica de azul de cresil, está relacionada à melhores taxas de maturação e de produção de embrião *in vitro* (ALM *et al.*, 2005).

Já foi demonstrado que a atividade da enzima G6PDH (em termos de unidades enzimáticas em um *pool* de células do *cumulus*) é 14 vezes maior nas células do *cumulus* do que no ovócito (CETICA *et al.*, 2002). A inibição da via pentose fosfato, da qual a G6PDH faz parte, inibe consideravelmente a maturação nuclear do ovócito bem como a quantidade de glutathiona (HERRICK, BRAD e KRISHER, 2006). Portanto, indica-se aqui a grande importância funcional do gene G6PDH, visto que ele é expresso em maior quantidade do que os demais genes do metabolismo da glicose testados.

A insulina é capaz de controlar a expressão de G6PDH em hepatócitos em cultivo por meio da via PI3-K, mas não através da via MAPK (WAGLE *et al.*, 1998),

indicando uma forte relação da via PI3-K com a expressão de G6PDH, corroborando os dados ora apresentados.

Deve-se salientar que no meio com 10 ng/mL de FSH há grande expansão das células do *cumulus* comparativamente ao meio 0FSH. Portanto, esse redirecionamento da glicose para a expansão pode ser uma possível explicação para os valores de expressão de G6PDH mais baixos no meio 10FSH.

Com relação à enzima PDH, trata-se de uma das mais importantes enzimas da via oxidativa ligada ao ciclo de Krebs e cadeia fosforilativa, entretanto outros artigos utilizando cultura de células adiposas de rato demonstra que a inibição da via PI3-K não causa alteração na atividade da PDH na presença de insulina, que é o estimulador clássico da enzima. Apenas com o inibidor da MAPK é que atinge-se níveis significativos de inibição da enzima (JOHNSON e DENTON, 2003). Essa informação é semelhante aos dados encontrados na presente tese e, comparativamente, indica que há outras vias de regulação da expressão do gene da PDH.

Relacionando os dados da expressão das enzimas metabólicas e a expulsão do corpúsculo polar, tem-se que a expressão de G6PDH acompanha o perfil encontrado, ou seja, a expressão da enzima diminui quando caem os valores de maturação do ovócito com a expulsão do corpúsculo polar.

A enzima G6PDH está relacionada à retomada e finalização da meiose de ovócitos, portanto há uma relação direta entre esses dois parâmetros, pois os substratos energéticos necessários para a meiose provém da via pentose fosfato (SUTTON-McDOWALL, GILCHRIST e THOMPSON, 2010).

Apesar da taxa de maturação nuclear no meio 10FSH e os valores de expressão de G6PDH menores comparativamente ao meio sem FSH, salienta-se que a glicose tem outras vias de metabolização. No com FSH a glicose é importante para expansão do *cumulus*, como supracitado, logo tem-se uma possível explicação para as diferenças encontradas.

O meio de cultura foi suplementado com androstenediona e a esteroidogênese pode influenciar o metabolismo. Estudos com tecido uterino de ratas submetidas à suplementação de hormônios esteróides indica que o 17 beta-estradiol causa aumento da atividade (MALINI e VANITHAKUMARI, 1992) e da expressão de G6PDH (FRASOR *et al.*, 2003). Portanto, encontra-se uma relação entre a enzima G6PDH e a produção de hormônios esteróides, porém nenhuma

relação com a ação da progesterona foi encontrada em pesquisas prévias (MALINI e VANITHAKUMARI, 1992).

O cultivo de tecido mamário com 17 beta-estradiol e o inibidor LY294002, indica que o hormônio provoca translocação do GLUT4 para a membrana por meio da via PI3-K/Akt, indicando uma relação fisiológica entre os dois parâmetros (GARRIDO *et al.*, 2013). Entretanto, não houve relação com a ação do transportador GLUT1 no mesmo experimento (GARRIDO *et al.*, 2013).

Portanto, dados na literatura corroboram para a regulação do metabolismo e sua interrelação com os hormônios esteróides sexuais, bem como a importância de ambos para o processo de amadurecimento do CCO.

Em relação a SNAP25, proteína relacionada a endocitose e exocitose, os dados aqui apresentados demonstram que há maior expressão de SNAP25 no meio 0FSH comparado ao meio 10FSH, porém sem relação com a via PI3-K.

Sabe-se que a expressão gênica de SNAP25 é estimulada por gonadotrofinas e é tempo-dependente. Após estimulação *in vivo* por hCG o pico de expressão do gene é as 8 horas e após as 24 horas os valores são mínimos (SHIMADA *et al.*, 2007). Há indícios de regulação da expressão de SNAP25 pelo receptor de progesterona (SHIMADA *et al.*, 2007) e pela presença de estradiol (JACOBSSON *et al.*, 1998).

Portanto, conclui-se que a expressão gênica de pontos-chave da nutrição do CCO podem ser usados como indicadores do status metabólico, uma vez que a expressão da enzima G6PDH estava relacionada a maturação nuclear do ovócito. Mais estudos são necessários para medir efetivamente o metabolismo do CCO e das células do cumulus e ovócito isoladamente. Também há dados inovadores a respeito da expressão de SNAP25, mas novos estudos são necessários para elucidar os efeitos do FSH sobre a expressão de SNAP25 em tempos de cultivo menores, bem como a relação dessa proteína com a nutrição dos CCOs de bovinos *in vitro*.

A análise do perfil de expressão gênica dos ovócitos cultivados está em andamento para complementação do conceito de unidade metabólica *cumulus-ovócito* nos meios testados.

## CONCLUSÕES

O meio MIV B sem FSH tem papel no desenvolvimento do CCO *in vitro* bastante evidente e determinado por estudos prévios (GULART, 2009; OLIVEIRA e SILVA, 2013). O perfil esteroidogênico do CCO cultivado no MIV B foi descrito no presente trabalho e indica a capacidade de manter elevada concentração de estradiol, razão E2/P4 e expressão dos receptores de FSH e LH e das enzimas da esteroidogênese, mimetizando uma condição de um folículo ovariano em crescimento. A imaturidade nuclear apresentada, ou seja, a não finalização da meiose, já foi apontada como um ponto benéfico para a progressão da maturação citoplasmática (OLIVEIRA e SILVA, 2008; OLIVEIRA e SILVA, 2013), logo temos dados para apontar a importância biotecnológica do meio MIV B para a PIVE de bovinos.

A adição de FSH ao meio MIV B não havia demonstrado efeito nas taxas de produção de embrião *in vitro*, visto que as taxas se assemelham ao sem FSH (GULART, 2009). O presente trabalho indica que há pronunciada progressão da meiose e elevada produção de estradiol, porém baixa expressão dos receptores de FSH e LH e das enzimas da esteroidogênese e elevada produção de progesterona após 22-24 horas de cultivo. Nesse contexto, a adição de FSH aumenta a expressão de Bcl-2 e de Bax, enquanto no meio 0FSH há baixa expressão de ambos nas células do cumulus.

No caso da expressão dos genes relacionados à esteroidogênese, tem-se a limitação de que, na presença de FSH, a presença do mRNA é tempo-dependente e decai progressivamente ao longo do tempo de cultivo (CALDER *et al.*, 2003). Logo, futuros trabalhos devem ser feitos para determinar esse mesmo efeito tempo-dependente do FSH no cultivo de CCOs.

Em termos de metabolismo, a expressão dos genes relacionados ao metabolismo da glicose demonstram bem a diferença entre o meio MIV B sem e com FSH. O único gene que não sofreu alteração foi o referente à enzima PDH. Os genes GLUT4 e o G6PDH foram inibidos na presença de FSH, enquanto o GLUT1 foi estimulado. Logo, tem-se uma clara diferença entre a presença e ausência de FSH que é, classicamente, um hormônio que estimula a captação e uso da glicose por CCOs (ROBERTS *et al.*, 2004). Nota-se também uma pronunciada expansão do *cumulus* no meio 10FSH, levando a inferência de que a glicose será direcionada para a produção de ácido hialurônico.

Em termos de SNAP25, o meio 0FSH estimulou e o 10FSH inibiu sua expressão e sua importância para a nutrição do CCO ainda precisa ser elucidada em experimentos futuros.

Com relação à importância da via PI3-K para a biologia do CCO, nota-se que a importância de uma via de sinalização celular durante o cultivo depende muito do meio de cultivo usado para a maturação *in vitro*, bem como da suplementação hormonal utilizada.

Em termos de maturação do ovócito, o inibidor da via PI3-K, o LY294002, causou a progressão da meiose no meio 0FSH até metáfase II e no meio 10FSH até anáfase I, porém suprimiu significativamente a expulsão do corpúsculo polar no meio 0FSH e 10FSH. Isso denota um controle diferencial entre a progressão da meiose e expulsão do corpúsculo polar. A via PI3-K não teve efeito sobre a expressão de Bcl-2 no meio com e sem FSH, porém em relação a expressão de Bax apenas o meio 10FSH respondeu com decaimento dos níveis de expressão.

Em relação à esteroidogênese, observa-se que o inibidor da via PI3-K foi capaz de inibir a produção de estradiol e a razão E2/P4 tanto na ausência quanto na presença de FSH. Além disso, no meio 0FSH foi capaz de inibir a expressão dos receptores de LH e FSH e a das enzimas CYP11A1, CYP19A1 e HSD17B1. Entretanto, na presença de FSH o inibidor da via PI3-K estimulou a expressão do receptor de LH e da enzima CYP19A1. Logo, na presença de FSH a via PI3-K suprime a expressão de LHR e CYP19A1 após 22 – 24 horas de cultivo.

Em termos de metabolismo, os genes PDH e SNAP25 não responderam a inibição da via PI3-K. No meio 0FSH GLUT1, GLUT4 e G6PDH foram inibidos, mas na presença de FSH apenas o gene da G6PDH foi suprimido.

Não se exclui a possibilidade de que no meio contendo FSH, a glicose seja direcionada para outras vias metabólicas, como a via de síntese de ácido hialurônico, podendo ser uma explicação para as diferenças observadas.

Deve-se lembrar que o precursor de hormônios esteróides utilizado no trabalho foi a androstenediona, logo parte do efeito observado pode se dever à sua presença. Os efeitos do FSH sobre os parâmetros mensurados também podem ser tempo-dependente, logo torna-se objeto de investigações futuras para elucidar tanto o efeito do FSH quanto a importância da via PI3-K na maturação *in vitro* de CCOs em cultivo no meio patenteado MIV B.

## REFERÊNCIAS

AARDEMA, H.; ROELEN, B.A.; VAN TOL, H.T.; OEI, C.H.; GADELLA, B.M.; VOS, P.L. Follicular 17beta-estradiol and progesterone concentrations and degree of *cumulus* cell expansion as predictors of *in vivo*-matured oocyte developmental competence in superstimulated heifers. **Theriogenology**, v. 80, p. 576–583. 2013.

ALM, H.; TORNER, H.; LÖHRKE, B.; VIERGUTZ, T.; GHONEIM, I.M.; KANITZ, W. Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Theriogenology**, v. 63, p. 2194 – 2205. 2005.

ANAS, M.-K.I., SHIMADA, M., TERADA, T. Possible role for phosphatidylinositol 3-kinase in regulating meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, v. 50, p. 347-56. 1998.

ANDREWS, S.; STEPHENS, L.R.L.; HAWKINS, P.T. PI3K Class IB Pathway. **Science's STKE: signal transduction knowledge environment**, v. 407, p. 2, 2007.

ARAKI, N.; SATO, K.; HAYASHI, K.; MIYAMOTO, A.; FUKUI, Y. Relationships among follicular fluid estradiol-17 $\beta$  concentration, morphology of *cumulus*-oocyte complex and developmental capacity of individual matured, fertilized and cultured bovine oocytes *in vitro*. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 44, p. 359-365. 1998.

ARMSTRONG, D.T.; XIA, P.; DE GANNES, G.; 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, p. 331-338. 1996.

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

BEUREL, E. & JOPE, R.S. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK-3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. **Progress in Neurobiology**, v. 79, p. 173-189. 2006.

BEVERS, M.M., IZADYAR, F. Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation. **Molecular Cellular Endocrinology**, v. 29, p.173-8. 2002.

BRINSTER, R.L. Embryo development. **Journal of Animal Science**, v. 38, p. 1003-1012. 1974.

BROWN, R. The Bcl-2 family of proteins. **British Medical Bulletin**, v. 53, p. 466-477. 1996.

BYSKOV, A.G.; ANDERSEN, C.Y.; HOSSAINI, A.; GUOLIANG, X. *Cumulus* cells of oocyte-*cumulus* complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulated with FSH. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, p. 296-305. 1997.

CALDER, M.D., CAVENEY, A.N., SIRARD, M., WATSON, A.J. Effect of serum and *cumulus* cell expansion on marker gene transcripts in bovine *cumulus*-oocyte complexes during maturation *in vitro*. **Fertility and Sterility**, v. 83, p. 1077-1085. 2005.

CALDER, M.D.; CAVENEY, A.N.; SMITH, L.C.; WATSON, A.J. Responsiveness of bovine *cumulus*-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation *in vitro*. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 14. 2003.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE FILHO, V.R. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction**, v. 3, p. 19-28. 2006.

CANTLEY, L.C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 296, p. 1655-1657, 2002.

CARNERO, A. e LACAL, J.C. Wortmannin, an inhibitor of phosphatidyl-inositol 3-kinase, induces oocyte maturation through a MPF-MAPK-dependent pathway. **FEBS Letters**, v. 422, p. 155-159. 1998.

CARRUTHERS, A.; DEZUTTER, J.; GANGULY, A.; DEVASKAR, S.U. Will the original glucose transporter isoform please stand up! **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v. 297, p. E836-48. 2009.

CETICA, P., PINTOS, L., DALVIT, G., BECONI, M. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation *in vitro*. **Reproduction**, v. 124, p. 675-681. 2002.

CETICA, P., PINTOS, L., DALVIT, G., BECONI, M. Involvement of enzymes of amino acid metabolism and tricarboxylic acid cycle in bovine oocyte maturation *in vitro*. **Reproduction**, v. 126, p. 753-63. 2003.

CHANNING, C.P. Effects of stage of the menstrual cycle and gonadotrophins on the luteinization of Rhesus monkey granulosa cells in culture. **Endocrinology**, v. 87, p. 49-60. 1970.

CHEN, L.; WERT, S.E.; HENDRIX, E.M.; RUSSELL, P.T.; CANNON, M.; LARSEN, W.J. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for

normal expansion of the *cumulus* mass. **Molecular Reproduction and Development**, v. 26, p. 236–47.1990.

CHEN, Y.J.; HSIAO, P.W.; LEE, M.T.; MASON, J.I.; KE, F.C.; HWANG, J.J. Interplay of PI3K and cAMP/PKA signaling, and rapamycin hypersensitivity in TGFbeta1 enhancement of FSH-stimulated steroidogenesis in rat ovarian granulosa cells. **Journal of Endocrinology**, v. 192, p. 405–419. 2007.

DEKEL, N.; KRAICER, P.F. Induction *in vitro* of mucification of rat *cumulus* oophorus by gonadotrophin and adenosine 3',5'-monophosphate. **Endocrinology**, v. 102, p. 1797-1802. 1978.

DOWNS, S.M., HUMPHERSON, P.G., MARTIN, K.L., LEESE, H.J. Glucose utilization during gonadotropin-induced meiotic maturation in *cumulus* cell-enclosed mouse oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 44, p. 121-31. 1996.

EBELING, S.; TÖPFER, D. e MEINECKE, B. Steroidogenesis and the Influence of MAPK Activity During *In vitro* Maturation of Porcine *Cumulus* Oocyte Complexes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 513–519. 2011.

EDWARDS, R.G. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, sig, rhesus, monkey and human ovarian oocytes. **Nature**, v. 208, p. 349-351. 1965.

ENGELMAN, J.A., LUO, J., CANTLEY, L.C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nature**, v. 7, p. 606-619. 2006.

FAIR, T. e LONERGAN, P. The Role of Progesterone in Oocyte Acquisition of Developmental Competence. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 142–147. 2012.

FAIR, T.; HULSHOF, S.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, p. 208-215. 1997.

FERGUSON, E.M. & LEESE, H.J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 116, p. 373-378. 1999.

FERREIRA, E.M., VIREQUE, A.A., ADONA, P.R., MEIRELLES, F.V., FERRIANI, R.A., NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, p. 836-48. 2009.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; EVANS, A.C.; TURZILLO, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 648-654. 2001.

FRASOR, J.; BARNETT, D.H.; DANES, J.M.; HESS, R.; PARLOW, A.F.; KATZENELLENBOGEN, B.S. Response-Specific and Ligand Dose-Dependent Modulation of Estrogen Receptor (ER)  $\alpha$  Activity by ER in the Uterus. **Endocrinology**, v. 144, p. 3159–3166. 2003.

FROLOVA, A.; FLESSNER, L.; CHI, M.; KIM, S.T.; FOYOUZI-YOUSEFI, N.; MOLEY, K.H. Facilitative Glucose Transporter Type 1 Is Differentially Regulated by Progesterone and Estrogen in Murine and Human Endometrial Stromal Cells. **Endocrinology**, v. 150, p. 1512–1520. 2009.

GARDNER, D.K.; LANE, M.; STEVENS, J.; SCHOOLCRAFT, W.B. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. **Fertility and Sterility**, v. 76, p. 1175-1180. 2001.

GARRIDO, P.; MORÁN, J.; ALONSO, A.; GONZÁLEZ, S.; GONZÁLEZ, C. 17 beta-Estradiol Activates Glucose Uptake via GLUT4 Translocation and PI3K/Akt Signaling Pathway in MCF-7 Cells. **Endocrinology**, v. 154, p. 1979–198. 2013.

GRIFFIN JE e OJEDA SR. **Textbook of endocrine physiology**. 5ª edição. Oxford University Press. 2004.

GROSSE, J.; BULLING, A.; BRUCKER, C.; BERG, U.; AMSTERDAM, A.; MAYERHOFER, A.; GRATZL, M. Synaptosome-associated protein of 25 kilodaltons in oocytes and steroid-producing cells of rat and human ovary: molecular analysis and regulation by gonadotropins. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 643-50. 2000.

GULART, L.V.M. Efeito do FSH sobre o desenvolvimento precoce de embriões bovinos derivados de oócitos maturados em meio de cultura definido e em sistema de co-cultura, promotores de bloqueio temporal da maturação. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília/ Faculdade de Medicina, 2009.

GUO, S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. **The Journal of Endocrinology**, v. 220, p. T1-T23. 2014.

GUTIERREZ, C.G.; CAMPBELL, B.K.; WEBB, R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle stimulating hormone, and morphological characteristics. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 608-616. 1997.

HAN, Y.; YAN, J.; ZHOU, J.; TENG, Z.; BIAN, F.; GUO, M.; MAO, G.; LI, J.; WANG, J.; ZHANG, M.; XIA, G. Acute fasting decreases the expression of GLUT1 and glucose utilization involved in mouse oocyte maturation and *cumulus* cell expansion. **Reproduction Fertility and Development**, v. 24, p.733-42. 2012.

HAWKINS, P.T.; ANDERSON, K.E.; DAVIDSON, K.; STEPHENS, L.R. Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, p. 647-62. 2006.

HERRICK, J.R.; BRAD, A.M. e KRISHER, R.L. Chemical manipulation of glucose metabolism in porcine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation *in vitro*. **Reproduction**, v. 131, p. 289 – 298. 2006.

HOSHINO, Y., YOKOO, M., YOSHIDA, N., SASADA, H., MATSUMOTO, H., SATO, E. Phosphatidylinositol 3-Kinase and Akt Participate in the FSH-Induced Meiotic Maturation of Mouse Oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 69, p. 77–86. 2004.

HOUDE, A.; LAMBERT, A.; SAUMANDE, J.; SILVERSIDES, D.W.; LUSSIER, J.G. Structure of the bovine follicle-stimulating hormone receptor complementary DNA and expression in bovine tissues. **Molecular Reproduction and Development**, v. 39, p. 127-35. 1994.

IM, S.S.; KWON, S.K.; KIM, T.H.; KIM, H.I.; AHN, Y.H. Regulation of Glucose Transporter Type 4 Isoform Gene Expression in Muscle and Adipocytes. **IUBMB Life**, v. 59, p. 134 – 145. 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE. Indicadores IBGE. Estatística da Produção Pecuária. Dezembro de 2013. Acessado pelo site: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201303\\_publ\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201303_publ_completa.pdf). Data de acesso: 27/01/2014.

ISOBE, N., NAKAO, T., YOSHIMURA, Y. Immunohistochemical localization of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the granulosa and theca interna layers of bovine cystic follicles. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 49, p. 227-233. 2003.

JACOBSSON, G.; RAZANI, H.; OGREN, S.O.; MEISTER, B. Estrogen down-regulates mRNA encoding the exocytotic protein SNAP-25 in the rat pituitary gland. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 10, p. 157-163. 1998.

JOHNSON, S.A. e DENTON, R.M. Insulin stimulation of pyruvate dehydrogenase in adipocytes involves two distinct signalling pathways. **The Biochemical Journal**, v. 369, p.351-6. 2003.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 6ª Edição. Editora Guanabara Koogan, 1997.

KANG, J.T.; ATIKUZZAMAN, M.; KWON, D.K.; PARK, S.J.; KIM, S.J.; MOON, J.H.; KOO, O.J.; JANG, G.; LEE, B.C. Developmental competence of porcine oocytes after *in vitro* maturation and *in vitro* culture under different oxygen concentrations. **Zygote**, v. 20, p. 1-8. 2012.

KASAI, H.; TAKAHASHI, N. e TOKUMARU, H. Distinct initial snare configurations underlying the diversity of exocytosis. **Physiological Reviews**, v. 92, p. 1915–1964. 2012.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 95-125. 2006.

LABRIE, F.; LUU-THE, V.; LIN, S.X.; SIMARD, J.; LABRIE, C.; EL-ALFY, M.; PELLETIER, G.; BELANGER, A. Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 1–16. 2000.

LEESE, H.J. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. **Reproduction**, v.143, p. 417-27.2012.

LEON, P.M.; CAMPOS, V.F.; KAEFER, C.; BEGNINI, K.R.; MCBRIDE, A.J.; DELLAGOSTIN, O.A.; SEIXAS, F.K.; DESCHAMPS, J.C.; COLLARES, T. Expression of apoptotic genes in immature and *in vitro* matured equine oocytes and cumulus cells. **Zygote**, v. 21, p. 279-85. 2013.

LI, H.; WANG, B.; ZHU, C.; FENG, Y.; WANG, S.; SHAHZAD, M.; HU, C.; MO, M.; DU, F.; YU, X. 17 $\beta$ -Estradiol Impedes Bax-Involved Mitochondrial Apoptosis of Retinal Nerve Cells Induced by Oxidative Damage via the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signal Pathway. **Journal of Molecular Neuroscience: MN**, v. 50, p. 482–493. 2013a.

LI, J.; WU, H.; XUE, G.; WANG, P.; HOU, Y. 17  $\beta$ -Oestradiol Protects Primary-Cultured Rat Cortical Neurons from Ketamine-Induced Apoptosis by Activating PI3K/Akt/Bcl-2 Signalling. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 113, p. 411–418. 2013b.

LI, Q.; NIWA, K.; HUNTER, M.G. Effects of 17 $\beta$ -Estradiol on *In vitro* Maturation of Pig Oocytes in Protein-Free Medium. **Journal of Reproduction and Development**, v. 50, p. 305-313. 2004.

LU, C.L.; WANG, T.R.; YAN, L.Y.; XIA, X.; ZHU, X.H.; LI, R.; ZHAO, H.C.; YAN, J.; YIN, T.L.; JIN, H.Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, W.X.; FENG, H.L.; QIAO, J. Gonadotropin-Mediated Dynamic Alterations During Bovine Oocyte Maturation *In vitro*. **Biology of Reproduction** , v. 91, p.44-52. 2014.

MALINI, T. e VANITHAKUMARI, G. Comparative progesterone study of the effects of beta-sitosterol, estradiol and on selected biochemical parameters of the uterus of ovariectomised rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 51-55. 1992.

MANI, A.M.; FENWICK, M.A.; CHENG, Z.; SHARMA, M.K.; SINGH, D.; WATHES, DC. IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol dependent kinase/ AKT in bovine granulosa cells. **Reproduction**, v. 139, p. 139–151. 2010.

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

McGOWAN, K.M.; LONG, S.D. e PEKALA, P.H. Glucose transporter gene expression: regulation of transcription and mRNA stability. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 66, p. 465-505. 1995.

MINGOTI, G.Z.; GARCIA, J.M. e ROSA E SILVA, A.A.M. Steroidogenesis in *cumulus* cells of bovine *cumulus*-oocyte-complexes matured *in vitro* with BSA and different concentrations of steroids. **Animal Reproduction Sciences**, v. 69, p. 175-186. 2002.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Acessado pelo site: <http://www.agricultura.gov.br/animal>. Data de acesso: 27/01/2014.

MITO, T.; YOSHIOKA, K.; NOGUCHI, M.; YAMASHITA, S.; HOSHI, H. Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone and Transforming Growth Factor-Alpha Enhance *In vitro* Maturation of Porcine Oocytes. **Molecular Reproduction & Development**, v. 80, p. 549–560. 2013.

MONTREZOR, L.H.; PICCINATO, C.A.; SILVA, A. Polyvinyl alcohol is effective in a defined media long-term bovine granulosa cell culture in the maintenance of 17 beta-estradiol production. **Biology of Reproduction Supplement**, v. 66, p. 280.2002.

MOORE, R.K.; OTSUKA, F. e SHIMASAKI, S. Role of ERK1/2 in the Differential Synthesis of Progesterone and Estradiol by Granulosa Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, p. 796–800. 2001.

MORITA, Y. e TILLY, J.L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. **Developmental Biology**, v. 213, p. 1-17. 1999.

MOTA, G. B.; KAISER, D.S.; OLIVEIRA E SILVA, I; TUANY, F.; PEREIRA, M. M.; CAMARGO, L. S. A.; Rosa a Silva, AAM. Insulin influences developmental competence of bovine oocytes cultured in  $\alpha$ -MEM plus follicle-stimulating hormone. **Zygote**, p. 1-10. 2014.

NELSON, D.L. & COX, M.M. **Principles of Biochemistry**. Nova York, USA. Freeman, 2005.

NISHIMOTO, H.; MATSUTANI, R.; YAMAMOTO, S.; TAKAHASHI, T.; HAYASHI, K.G.; MIYAMOTO, A.; HAMANO, S.; TETSUKA, M. Gene expression of glucose

transporter (GLUT) 1, 3 and 4 in bovine follicle and corpus luteum. **Journal of Endocrinology**, v. 188, p. 111–119. 2006.

NONATO JUNIOR, I.; RUFINO, F.A., SANCHES, B.V., PONTES, J. H. F.; UVO, S.; ERENO JUNIOR, J. C.; SENEDA, M.M. Produção de embriões em vacas Nelore com a utilização associada de FIV e TE. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 95, 2004.

OLIVEIRA e SILVA, I. Avaliação da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos em sistemas de cultura definidos. Tese de doutorado – Universidade de Brasília/ Faculdade de Medicina, 2013.

OLIVEIRA e SILVA, I. Inibição e reversão da maturação nuclear, avaliação da maturação citoplasmática e produção de esteróides em complexo *cumulus oophorus* bovinos co-cultivados em hemiseções foliculares em meio de cultura definido. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília/ Faculdade de Medicina, 2008.

OLIVEIRA E SILVA, I.; VASCONCELOS, R.B.; CAETANO, J.V.; GULART, L.V.; CAMARGO, L.S.; BÃO, S.N.; ROSA E SILVA, A.A. Induction of reversible meiosis arrest of bovine oocytes using a two-step procedure under defined and non defined conditions. **Theriogenology**, v. 75, p. 1115-24. 2011.

ORISAKA, M., TAJIMA, K., TSANG, B. K., KOTSUJI F. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular Development. **Journal of Ovarian Research**, v.2, p. 9-15. 2009.

OSBORNE, S.L.; WEN, P.J. e MEUNIER, F.A. Phosphoinositide regulation of neuroexocytosis: adding to the complexity. **Journal of Neurochemistry**, v. 98, p. 336–342. 2006.

OTSUKA, F.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 11387–11392. 2001.

PICCINATO, C.A.; MONTREZOR, L.H.; COLLARES, C.A.; VIREQUE, A.A.; ROSA E SILVA, A.A. Norepinephrine stimulates progesterone production in highly estrogenic bovine granulosa cells cultured under serum-free, chemically defined conditions. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, p. 95. 2012.

PIPER, R.C.; JAMES, D.E.; SLOT, J.W.; PURI, C.; LAWRENCE, J.C. Jr. GLUT4 phosphorylation and inhibition of glucose transport by dibutyryl cAMP. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 16557 – 16563. 1993.

PROCHAZKA, R.; BLAHA, M.; NEMCOVA, L. Signaling pathways regulating FSH- and amphiregulin-induced meiotic resumption and *cumulus* cell expansion in the pig. **Reproduction**, v. 144, p. 535–546. 2012.

PURCELL, S.H.; CHI, M.M. e MOLEY, K.H. Insulin-Stimulated Glucose Uptake Occurs in Specialized Cells within the *Cumulus* Oocyte Complex. **Endocrinology**, v. 153, p. 2444–2454. 2012.

RECCO-PIMENTEL, S.M.; AGUIAR JÚNIOR, O. **A Célula**. 2ª edição. São Paulo: Editora Manole. 2007. 380p. Editado por CARVALHO, H.F. e RECCO-PIMENTEL, S.M.

RICHARD, F.J. & SIRARD, M.A. Effects of harvest methods of bovine oocytes co-cultured with follicular hemisections *in vitro* on nuclear maturation. **Theriogenology**, v. 46, p. 1243-50. 1996.

ROBERTS, R.; STARK, J.; IATROPOULOU, A.; BECKER, D.L.; FRANKS, S.; HARDY, K. Energy substrate metabolism of mouse *cumulus*-oocyte complexes: response to follicle-stimulating hormone is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase pathway and is associated with oocyte maturation. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 199-209. 2004.

ROSA E SILVA, A.A.M., OLIVEIRA E SILVA, I., VASCONCELOS, R.B., GULART, L.V.M., ROSA E SILVA, L.G. Meios de cultura para maturação de oócitos de mamíferos, processo de obtenção dos mesmos e processos de inibição-reversão da maturação nuclear e aceleração da maturação citoplasmática e suas aplicações para a produção de embrião *in vitro*. Número IP de patente 0803140-1, depositado em 12/05/2008, Fundação Universidade de Brasília.

SAGIRKAYA, H., MISIRLIOGLU, M., KAYA, A., FIRST, N., PARRISH, J., MEMILI, E. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. **Animal Reproduction Science**, v.101, p. 225-240, 2007.

SAHMI, M.; NICOLA, E.S. e PRICE, C.A. Hormonal regulation of cytochrome P450 aromatase mRNA stability in non-luteinizing granulosa cells *in vitro*. **Journal of Endocrinology**, v. 190, p. 107-115. 2006.

SAHMI, M.; NICOLA, E.S.; PRICE, C.A. Hormonal regulation of cytochrome P450 aromatase mRNA stability in non-luteinizing bovine granulosa cells *in vitro*. **Journal of Endocrinology**, v. 190, p. 107-115. 2006.

SALHAB, M.; TOSCA, L.; CABAU, C.; PAPILLIER, P.; PERREAU, C.; DUPONT, J.; MERMILLOD, P.; UZBEKOVA, S. Kinetics of gene expression and signaling in bovine *cumulus* cells throughout IVM in different mediums in relation to oocyte developmental competence, *cumulus* apoptosis and progesterone secretion. **Theriogenology**, v. 75, p. 90 –104. 2011.

SALTIEL, A.R. & KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414, p. 799-806. 2001.

SALUSTRI, A.; YANAGISHITA, M.; HASCALL, V.C. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse *cumulus* cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 13840–7.1989.

SENEDA, M.M.; MARINHO, L.S.R.; UNTURA, R.M.; MOROTTI, F.; MOINO, L.L.; RIGO, A.G.; SANCHES, B.V.; PONTES, J.H.F. Large-scale programs for recipients of *in vitro*-produced embryos. **Animal Reproduction**, v.9, p.323-328. 2012.

SHIMADA, M. e TERADA, T. Phosphatidylinositol 3-Kinase in *Cumulus* Cells and Oocytes Is Responsible for Activation of Oocyte Mitogen-Activated Protein Kinase During Meiotic Progression Beyond the Meiosis I Stage in Pigs. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1106–1114. 2001.

SHIMADA, M.; ITO, J.; YAMASHITA, Y.; OKAZAKI, T.; ISOBE, N. Phosphatidylinositol 3-kinase in *cumulus* cells is responsible for both suppression of spontaneous maturation and induction of gonadotropin-stimulated maturation of porcine oocytes. **Journal of Endocrinology**, v. 179, p. 25–34. 2003.

SHIMADA, M.; MAEDA, T. e TERADA, T. Dynamic Changes of Connexin-43, Gap Junctional Protein, in Outer Layers of *Cumulus* Cells Are Regulated by PKC and PI 3-Kinase During Meiotic Resumption in Porcine Oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1255–1263. 2001.

SHIMADA, M.; YANAI, Y.; OKAZAKI, T.; YAMASHITA, Y.; SRIRAMAN, V.; WILSON, M.C.; RICHARDS, J.S. Synaptosomal-associated protein 25 gene expression is hormonally regulated during ovulation and is involved in cytokine/chemokine exocytosis from granulosa cells. **Molecular Endocrinology**, v. 21, p. 2487-502. 2007.

SHIMADA, M.; ZENG, W-X. e TERADA, T. Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase or Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Leads to Suppression of p34cdc2 Kinase Activity and Meiotic Progression Beyond the Meiosis I Stage in Porcine Oocytes Surrounded with *Cumulus* Cells. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 442–448. 2001.

SILVA, J.M. e PRICE, C.A. Insulin and IGF-1 are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells *in vitro*. **Journal of Endocrinology**, v. 174, p. 499-507. 2002.

SILVA, J.M. e PRICE, C.A. Insulin and IGF-1 are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic granulosa cells *in vitro*. **The Journal of Endocrinology**, v. 174, p. 499-507. 2002.

SILVA, J.M.; HAMEL, M.; SAHMI, M.; PRICE, C.A. Control of oestradiol secretion and of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid accumulation by

FSH involves different intracellular pathways in oestrogenic bovine granulosa cells *in vitro*. **Reproduction**, v. 132, p. 909–917. 2006.

SIMPSON, E.R., MAHENDROO, M.S., MEANS, G.D., KILGORE, M.W., HINSHELWOOD, M.M., GRAHAM-LORENCE, S., AMARNEH, B., ITO, Y., FISHER, C.R., MICHAEL, M.D., MENDELSON, C.R., BULUN, S.E. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. **Endocrine Reviews**, v. 15, p. 342–355. 1994.

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

SIRARD, M.A. Temporary inhibition of meiosis resumption *in vitro* by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 33.p757-67. 1990.

SIRARD, M.-A.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. *In vivo* and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**, v. 68S, p. S71–S76. 2007.

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

SOBINOFF, A.P.; SUTHERLAND, J.M.; McLAUGHLIN, E.A. Intracellular signalling during female gametogenesis. **Molecular Human Reproduction**, v. 19, p. 265-278. 2013.

SPICER, L.J.; AAD, P.Y.; ALLEN, D.; MAZERBOURG, S.; HSUEH, A.J. Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. **The Journal of Endocrinology**, v. 189, p. 329–39. 2006.

STOCCO C. Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. **Steroids**, v. 73, p. 473-87. 2008.

SU, Y.Q.; NYEGAARD, M.; OVERGAARD, M.T.; QIAO, J.; GIUDICE, L.C. Participation of Mitogen-Activated Protein Kinase in Luteinizing Hormone-Induced Differential Regulation of Steroidogenesis and Steroidogenic Gene Expression in Mural and *Cumulus* Granulosa Cells of Mouse Preovulatory Follicles. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 859–867. 2006.

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

SUTTON-McDOWALL, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. *Cumulus* expansion and glucose utilisation by bovine *cumulus*–oocyte complexes during *in*

*in vitro* maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. **Reproduction**, v. 128, p. 313–319. 2004.

SUTTON-McDOWALL, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction**, v. 139, p. 685-95. 2010.

TAKAKUBO, F. e DAHL, H.H. The expression pattern of the pyruvate dehydrogenase E1 alfa subunit genes during spermatogenesis in adult mouse. **Experimental Cell Research**, v. 199, p. 39-49. 1992.

TARUMI, W.; TSUKAMOTO, S.; OKUTSU, Y.; TAKAHASHI, N.; HORIUCHI, T.; ITOH, M.T.; ISHIZUKA, B. Androstenedione induces abnormalities in morphology and function of developing oocytes, which impairs oocyte meiotic competence. **Fertility and Sterility**, v. 97, p. 469–76. 2012.

TATEMOTO, H.e TERADA, T. Activation of p34<sup>cdc2</sup> kinase around the meioticresumption in bovine oocytes cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 45, p. 427–437. 1996.

THIBIER, M. New records in the numbers of both *in vivo*-derived and *in vitro*-produced bovine embryos around the world in 2006. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 25. 2007.

THOMPSON, J.G. The impact of nutrition of the *cumulus* oocyte complex and embryo on subsequent development in ruminants. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, p. 169-175. 2006.

THOMPSON, J.G.; SHERMAN, A.N.; ALLEN, N.W.; MCGOWAN, L.T.; TERVIT, H.R. Total protein content and protein synthesis within pre-elongation stage bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 50, p. 139-145. 1998.

TRIPATHI, A., KUMAR, K.V.P., CHAUBE, K. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocyte. **Journal of Cellular Physiology**, v. 223, p. 592-600. 2010.

VANHAESEBROECK, B.; GUILLERMET-GUIBERT, J.; GRAUPERA, M.; BILANGES, B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signaling. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 11, p. 329-41. 2010.

VASCONCELOS, R.B. Caracterização morfofuncional das células somáticas de folículo ovariano bovino, cultivado em meio de cultura definido, não indutor de luteinização. Dissertação de Mestrado – PPG Ciências Médicas, Universidade de Brasília (UnB). 2008.

VASCONCELOS, R.B.; SALLES, L.P.; OLIVEIRA E SILVA, I.; GULART, L.V.; SOUZA, D.K.; TORRES, F.A.; BOCCA, A.L.; ROSA E SILVA, A.A. Culture of bovine ovarian follicle wall sections maintained the highly estrogenic profile under basal and

chemically defined conditions. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, p. 700-707. 2013.

VELAZQUEZ, M.A.; ZARAZA, J.; OROPEZA, A.; WEBB, R.; NIEMANN, H. The role of IGF1 in the *in vivo* production of bovine embryos from superovulated donors. **Reproduction**, v. 137, p. 161–180. 2009.

VIANA, J.H.M. & CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 915-919. 2007.

VIANA, J.H.M.; DE ALMEIDA CAMARGO, L.; DE MORAES FERREIRA, A.; DE SA, W.; DE CARVALHO FERNANDES, C.; DE PINHO MARQUES JUNIOR, A. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, v.84, p.1-12. 2004.

VIREQUE, A.A.; CAMARGO, L.S.A.; SERAPIÃO, R.V.; ROSA E SILVA, A.A.M.; WATANABE, Y.F.; FERREIRA, E.M.; NAVARRO, P.A.A.S.; MARTINS, W.P.; FERRIANI, R.A. Preimplantation development and expression of Hsp-70 and Bax genes in bovine blastocysts derived from oocytes matured in alpha-MEM supplemented with growth factors and synthetic macromolecules. **Theriogenology**, v. 71, p. 620-627. 2009.

VITT, U.A.; HAYASHI, M.; KLEIN, C.; HSUEH, A.J. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 370–7. 2000.

WAGLE, A.; JIVRAJ, S.; GARLOCK, G.L.; STAPLETON, S.R. Insulin regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression is rapamycin-sensitive and requires phosphatidylinositol 3-kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 14968-74. 1998.

WANG, H.F.; ISOBE, N.; KUMAMOTO, K.; YAMASHIRO, H.; YAMASHITA, Y.; TERADA, T. Studies of the role of steroid hormone in the regulation of oocyte maturation in cattle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p. 4. 2006.

WANG, X.; LIU, X-T.; DUNN, R.; OHL, D.A.; SMITH, G.D. Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Mouse Oocyte Homologue Segregation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64, p. 96–105. 2003.

WILDING, M.; Di MATTEO, L.; DALE, B. The maternal age: a hypothesis based on oxidative phosphorylation. **Zygote**, v. 13, p. 317-323. 2005.

WRENZYCKI, C.; HERRMAN, D.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**, v. 68S, p. S77-S83. 2007.

WU, B.; IGNOTZ, G.G.; CURRIE, B.; YANG, X. Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and *cumulus* cells during maturation *in vitro* of bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 560-565. 1996.

WU, L.G.; HAMID, E.; SHIN, W.; CHIANG, H.C. Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. **Annual Review of Physiology**, v. 76, p. 301-31. 2014.

XIE, M.; YI, X.; WANG, R.; WANG, L.; HE, G.; ZHU, M.; QI, C.; LIU, Y.; YE, Y.; TAN, S.; TANG, A. 14-Thienyl Methylene Matrine (YYJ18), the Derivative from Matrine, Induces Apoptosis of Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells by Targeting MAPK and PI3K/Akt Pathways *in vitro*. **Cell Physiology and Biochemistry**, v. 33, p. 1475-1483. 2014.

YU, F.Q.; HAN, C.S.; YANG, W.; JIN, X.; HU, Z.Y.; LIU, Y.X. Activation of the p38 MAPK pathway by follicle-stimulating hormone regulates steroidogenesis in granulosa cells differentially. **Journal of Endocrinology**, v. 186, p. 85–96. 2005.

ZHENG, P.; BAIBAKOV, B.; WANG, X.H.; DEAN, J. PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> is constitutively synthesized and required for spindle translocation during meiosis in mouse oocytes. **Journal of Cell Science**, v. 126, p. 715-21.2013.

ZHENG, W.; NAGARAJU, G.; LIU, Z.; LIU, K. Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3Ks) signaling in the mammalian ovary. **Molecular Cellular Endocrinology**, v. 356, p. 24-30. 2012.

ZHENG, X.; PRICE, C.A.; TREMBLAY, Y.; LUSSIER, J.G.; CARRIÈRE, P.D. Role of transforming growth factor-beta1 in gene expression and activity of estradiol and progesterone-generating enzymes in FSH-stimulated bovine granulosa cells. **Reproduction**, v. 136, p. 447–457. 2008.

ZYLBERSZTEJN, K. e GALLI, T. Vesicular traffic in cell navigation. **FEBS Journal**, v. 278, p. 4497–4505. 2011.