RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 25/08/2017.

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Instituto de Biociências

Campus de Botucatu

O SISTEMA FOLICULAR: DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA MATURAÇÃO OOCITÁRIA *IN VITRO* QUE RETARDA A MATURAÇÃO NUCLEAR E PROLONGA A COMUNICAÇÃO ENTRE O OÓCITO E CÉLULAS DO CUMULUS

Ana Caroline Silva Soares

Botucatu - SP

Fevereiro de 2016

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Instituto de Biociências

Campus de Botucatu

O SISTEMA FOLICULAR: DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA MATURAÇÃO OOCITÁRIA *IN VITRO* QUE RETARDA A MATURAÇÃO NUCLEAR E PROLONGA A COMUNICAÇÃO ENTRE O OÓCITO E CÉLULAS DO CUMULUS

Ana Caroline Silva Soares

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista-Unesp, para obtenção de grau de Mestre em Ciências Biológicas, Área Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Buratini Junior

Botucatu - SP

Fevereiro de 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Soares, Ana Caroline da Silva.
O sistema folicular : desenvolvimento de um protocolo para maturação oocitária *in vitro* que retarda a maturação nuclear e prolonga a comunicação entre o oócito e células / Ana Caroline da Silva Soares. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: José Buratini Junior
Capes: 21001006

1. Peptídeos. 2. Vesícula. 3. Células germinativas. 4. Genes. 5. Técnicas de maturação *in vitro* de oócitos. 6. Reprodução.

Palavras-chave: AREG; GVDB; NPPC.

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Instituto de Biociências

Campus de Botucatu

O SISTEMA FOLICULAR: DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA MATURAÇÃO OOCITÁRIA *IN VITRO* QUE RETARDA A MATURAÇÃO NUCLEAR E PROLONGA A COMUNICAÇÃO ENTRE O OÓCITO E CÉLULAS DO CUMULUS

ANA CAROLINE SILVA SOARES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista-Unesp, para obtenção de grau de Mestre em Ciências Biológicas, Área Farmacologia

BOTUCATU-SP

Fevereiro de 2016

Ana Caroline Silva Soares
Botucatu, 25 de Fevereiro de 2016

Composição da Banca Examinadora

_____
Prof. Dr. José Buratini Jr

_____
Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles

_____

Prof.(a) Dr.(a) Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Dedicatória

Este trabalho é dedicado à minha família, em especial meus pais José Mota e Rovene, e avós Francisco, Osória, Aparecida e Joaquim (*In memoriam*) e tios, pelos ensinamentos e paciência. À minha irmã Laura pelo carinho de sempre. E à minha bisavó Olívia (*In memoriam*) que sempre me acompanha.

Agradecimentos

Ao meu orientador, **Prof. Dr. José Buratini Jr**, agradeço por ter depositado em mim sua confiança e principalmente pelos incentivos diários que me motivam a desenvolver o trabalho científico.

Aos colaboradores **Prof. Dr. Alberto Maria Luciano** e **Dra. Valentina Lodde**, do Laboratório de Biologia Reprodutiva e do Desenvolvimento da Universidade de Milão, Itália, por terem me acolhido em seu laboratório e em seu ambiente familiar e pelas intensas discussões científicas que transformaram minha visão científica.

Ao **Prof. Dr. Christopher A. Price**, do Centro de Pesquisa em Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Montreal, Canadá, pelos ensinamentos e constantes discussões ao longo do desenvolvimento dos experimentos.

À **Prof. Dra. Fernanda Landim da Cruz** e suas alunas **Carol e Paula**, por permitir o acesso ao seu laboratório sempre dispostas ajudar e com boas ideias para o trabalho.

Aos **professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia**, pela amizade e dedicação ao trabalho.

Aos excelentes colegas de laboratório **Lorena, Rodrigo e Paula,** por estarem sempre dispostos a ajudar mesmo nos períodos de trabalho madrugada a fora, além de tornarem o ambiente fora e dentro do trabalho mais feliz. Obrigada pelo companheirismo e amizade desses anos, sem vocês este trabalho não seria possível.

Aos **alunos do Laboratório FitoFarmaTec**, em especial à Fernanda, Priscila, Patrícia, Elisa, Eduardo e Ramon, pelos momentos de “cafézinho”, happy hours e afins e por estarem sempre dispostos a ajudar. Obrigada pelos momentos de trabalho e diversão juntos.

Aos **Dr. Anthony Castilho** e **Dra. Mariana Fernandes** pelas valorosas discussões científicas e por estarem sempre prontamente dispostos a passar seus conhecimentos e também pela amizade dentro e fora do ambiente de trabalho.

Aos **amigos da pós graduação**, Katiussia, Larissa, José Sérgio, Victor e Fernando, por compartilharem sempre os anseios e medos dessa jornada e pela amizade e companheirismo de sempre.

Ao amigo **Diego** por me indicar esse caminho e pela ajuda em momentos difíceis, e também pelo carinho, confiança e amizade.

Às amigas e companheiras **Fernanda** e mais uma vez **Lorena**, por compartilharem comigo a casa e suas vidas e pela intensa amizade em todos os momentos.

Aos **membros da banca de defesa** pela disponibilidade e por terem aceitado o convite.

À **Capes** e à **Fapesp**, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível."

Charles Chaplin

LISTA DE FIGURAS

1. A) Effects of follicular steroids and NPPC on the percentage of GV oocytes in *Bos indicus.* COCs were cultured with treatments B (basic medium), B+NPPC (basic medium with NPPC), FS (basic medium with follicular steroids) and FS+NPPC (basic medium with NPPC and follicular steroids) for 6 hours (n=9 replicates with 15 oocytes each). B) Representative images showing a GV oocyte stained with Hoechst 33342 and visualized under a fluorescence microscope (400x). Different letters indicate statistically significant differences (P<0.05)……..……39

2. A) Effects of follicular steroids and NPPC on the percentage of GV oocytes in *Bos indicus.* COCs were cultured with treatments B (basic medium), B+NPPC (basic medium with NPPC), FS (basic medium with follicular steroids) and FS+NPPC (basic medium with NPPC and follicular steroids) for 9 hours (n=4 replicates with 15-20 oocytes each). B) Same as above in *Bos taurus* (n=3 replicates with 15-20 oocytes each) Different letters indicate statistically significant differences (P <0.05)……40

3. A) Effects of follicular steroids and NPPC on the percentage of COCs with opened GJ in *Bos taurus.* COCs were cultured with treatments B (basic medium), B+NPPC (basic medium with NPPC), FS (basic medium with follicular steroids) and FS+NPPC (basic medium with NPPC and follicular steroids) for 9 hours (n=3 replicates with 15-20 oocytes each). B) Representative images showing opened GJ communication, Lucifer Yellow was injected into the oocyte

and the COC was visualized under a fluorescence microscope (400x). Different letters indicate statistically significant differences (P <0.05)…….....……41

4. Effects of AREG and FSH on the percentage of oocytes reaching meiosis I (MI, graph A) and meiosis II (MII, graph B) at 20, 22 and 24 hours of culture in *Bos Taurus* (n= 5 replicates). C) Representative images depicting MI and MII, respectively; oocytes were stained with Propidium Iodide and visualized under a fluorescence microscope (400x). The asterisk indicates the only statistically significant difference (P <0.05)…….....……..……...42/43

5. Effects of IVM with AREG or FSH for 24 hours (n= 3 replicates with 15-20 oocytes each) on embryo production as measured by the percentage of blastocysts in relation to total oocytes (A), and percentage of expanded and hatched blastocysts in relation to total blastocysts (B) in *Bos taurus*. Treatments did not alter embryo production significantly (P >0.05).....43/44

6. Effects of follicular steroids and NPPC added separately or together in a pre-IVM culture on embryo production as measured by the percentage of blastocysts in relation to total oocytes **(A),** and percentage of expanded and hatched blastocysts in relation to total blastocysts **(B).** *Bos indicus* COCs were cultured with treatments B (basic medium), B+NPPC (basic medium with NPPC), FS (basic medium with follicular steroids) and FS+NPPC (basic

medium with NPPC and follicular steroids) for 9 hours, followed by IVM with AREG for 24 hours (n=3 replicates with 15-20 oocytes each). Treatments did not alter embryo production significantly (P >0.05).....44/45

Sumário

RESUMO 2
CAPÍTULO 1 3
1 INTRODUÇÃO 4
2 REVISÃO DE LITERATURA 6
2.1 Interação entre oócito e células adjacentes 6
2.2 Maturação oocitária 9
2.3 Mecanismos de retomada da meiose 11
2.4 Junções GAP na maturação oocitária 12
2.5 Hormônios esteroides e fator semelhante a insulina-1 (IGF-1) 14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 16
CAPÍTULO 2 23
Follicular steroids cooperate with NPPC to delay nuclear maturation and to increase oocyte-cumulus communication in cattle 23
ABSTRACT 24
INTRODUCTION 25
MATERIALS AND METHODS 27
RESULTS 33
DISCUSSION 34
FIGURES 39
REFERENCES 45
CONSIDERAÇÕES FINAIS 49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 51

RESUMO

A comunicação entre o oócito e células somáticas adjacentes é essencial para a diferenciação do complexo cumulus-oócito (COC). Essa comunicação é proporcionada por processos citoplasmáticos trans-zonais (TZP) que penetram através da zona pelúcida e atingem a membrana do oócito, onde junções do tipo gap permitem transporte bidirecional de sinais elétricos e moléculas reguladoras. A maturação oocitária *in vivo* é controlada por gonadotrofinas e peptídeos intra-ovarianos e desencadeada pelo pico de LH. Este, induz a expressão dos fatores EGF-like que desencadeiam uma série de fatores que levam a fosforilação das conexinas, e com isso o fechamento de junções gap e consequentemente perda dos efeitos inibitórios do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), proporcionando assim a retomada da meiose. O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos da inclusão de uma fase de pré maturação seguida da maturação *in* vitro sobre a progressão da meiose, funcionalidade das junções gap e produção embrionária. A pré maturação foi empregada utilizando componentes de ordem fisiológica encontradas no ambiente folicular, e esta, foi capaz de retardar a quebra da vesícula germinativa (VGBD), enquanto favoreceu a comunicação entre oócito e células do cumulus, o que acreditamos ser beneficial para o desenvolvimento oocitário *in vitro.* No entanto, quando seguida da maturação *in vitro* também utilizando componentes fisiológicos, foi capaz de produzir blastocistos, porém não foi eficiente em melhorar as taxas e o desenvolvimento embrionário.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O emprego das biotécnicas da reprodução, tem como um de seus objetivos, o aumento do potencial reprodutivo da fêmea, uma vez que os ovários de um animal em idade reprodutiva estão repletos de folículos imaturos que não serão ovulados, resultando em grande desperdício de células germinativas femininas. Com o objetivo de melhor explorar o potencial reprodutivo e genético de fêmeas, diversas biotecnologias reprodutivas têm sido aprimoradas, tais como superovulação seguida de transferência de embriões (TE) e produção *in vitro* de embriões (PIV), esta última compreendendo a maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV).

Estas biotecnologias tiveram avanços consideráveis e têm sido utilizadas para aumentar a produção de embriões bovinos tanto para uso em pesquisa como para aumentar a produtividade dos rebanhos. Contudo, as condições de cultivo ainda não conseguem mimetizar em laboratório as condições encontradas *in vivo*, o que acaba gerando situações indesejáveis como o descompasso entre a maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos e alterações epigenéticas nos embriões, que comprometem a taxa de sucesso na PIV (MACHALKOVA *et al.,* 2004).

A maturação oocitária apresenta-se como um dos gargalos da PIV, já que sua eficiência é amplamente superior quando realizada em condições fisiológicas em comparação ao sistema *in vitro* (RIZOS *et al.,* 2002; FARIN *et al.,* 2007). O ambiente folicular permite que o oócito se mantenha em parada

meiótica, denominada também como estado de vesícula germinativa (VG) e, posteriormente, após o pico ovulatório do hormônio luteinizante (LH), fatores intrafoliculares mediam a retomada da meiose e a diferenciação do cumulus (GILCHRIST, 2011). O conhecimento e consideração desses mecanismos intrafoliculares de controle é fundamental para a melhoria da maturação *in vitro* (MIV), que deve proporcionar a progressão da meiose resultante da maturação do núcleo, em perfeita sincronia com a maturação do citoplasma do oócito (SÁNCHEZ & SMITZ, 2012).

Visando melhorar a MIV, várias modificações no sistema de cultivo têm sido propostas, tais como o estabelecimento de duas fases de cultivo, incluindo uma fase de pré-maturação do oócito na presença de inibidores da maturação nuclear, majoritariamente inibidores de fosfodiesterases oocitárias. Esses agentes farmacológicos levam ao aumento de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e assim ao retardo da retomada da meiose (MACHALKOVA *et al.,* 2004; SIRARD *et al.,* 1993). O uso de agentes farmacológicos pode acarretar em efeitos colaterais, por isso deve-se realizar vários testes antes de se utilizar esses componentes na clínica.

O presente estudo teve como objetivo iniciar o desenvolvimento de um sistema para MIV incluindo um cultivo pré maturação, em que os complexos cumulus-oócito (COCs) são submetidos a condições mais próximas às encontradas no folículo ovulatório em sua fase final de diferenciação, a fim de proporcionar maior sintonia entre a maturação nuclear e citoplasmática do oócito e a diferenciação das células do cumulus. Mais especificamente, testou-se a hipótese de que o cultivo pré maturação do COC na presença de concentrações de FSH (hormônio folículo estimulante) , hormônios esteroides e

peptídeo natriurético do tipo C (NPPC) próximas às fisiológicas, retardaria a retomada da meiose, beneficiaria a comunicação entre as células do cumulus e o oócito e aumentaria a produção embrionária após indução da maturação do COC de forma mais fisiológica, substituindo as altas dose de FSH por ampirregulina (AREG), hormônios esteroide e fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF 1).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Interação entre oócito e células adjacentes

Concomitante com o início do crescimento dos oócitos, as células somáticas vizinhas começam a proliferar formando várias camadas. Esta fase inicial de crescimento do oócito e desenvolvimento dos folículos parece ocorrer independentemente dos hormônios gonadotróficos (revisado por BUCCIONE, *et al.,* 1990). Uma vez que o folículo acumula camadas de células da granulosa formando uma estrutura multilaminar sólida, o espaço extracelular expande-se formando uma cavidade chamada antro (ANDERSON & ALBERTINI, 1976). As células da granulosa de folículos pré-antrais são diferenciadas em dois grupos durante a transição para a fase antral: as células do cumulus, que estão diretamente associadas ao oócito, e as células da granulosa murais, que circundam internamente a parede folicular adjacentes à camada da teca. Apesar da semelhança entre esses dois tipos celulares, existem diferenças quanto à produção de transcritos e proteínas (LATHAM *et al.,* 1999).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A comunicação entre oócito e células do cumulus é essencialmente importante para o crescimento e diferenciação do oócito. Além dos fatores secretados pelo oócito, a comunicação mediada por junções do tipo gap é particularmente importante para o suporte enérgico e para o controle da remodelagem da cromatina e do progresso da meiose no oócito. Em resumo, este trabalho demonstrou que a inserção de uma fase anterior à maturação *in vitro*, utilizando fatores fisiológicos encontrados no folículo, é capaz de atrasar a progressão da meiose, enquanto aumenta a comunicação entre o oócito e as células do cumulus através das junções gap. Ao contrário do que ocorre *in* vivo, com a retirada do oócito do folículo essa comunicação se perde abruptamente, o que prejudica o subsequente desenvolvimento oocitário e sua fertilidade.

Além disso, dados do presente estudo sugerem uma diferença importante entre as sub-espécies bovinas. Em *Bos taurus,* a quebra da vesícula germinativa parece ocorrer de forma mais abrupta do que em *Bos indicus*. Esse fato, ressalta a importância da regulação da quebra da vesícula germinativa como ponto crucial na otimização do processo de MIV acarretando em benefícios na produção embrionária, principalmente nas raças taurinas em que a retomada de meiose parece ocorrer mais precocemente, o que pode comprometer capacidade oocitária para o desenvolvimento.

Apesar do fato de que a fase de pré-maturação teve o efeito esperado em manter os oócitos por mais tempo em parada meiótica, o que acreditamos ser beneficial para aquisição de competência oocitária, quando associado ao

meio de maturação contendo AREG como fator de indução da maturação, isto não causou aumento nas taxas de produção de embriões *in vitro.* A partir disso, surgiram algumas especulações. Durante a fase tardia da foliculogênese, logo antes do pico de LH, o FSH se liga ao seu receptor nas células da granulosa murais, estimulando assim a expressão dos receptores de LH (ERICKSON *et al.,* 1979) e receptores do fator de crescimento epidermal (EGFR). Em recentes estudos foi demonstrado que o FSH é necessário para a expressão e atividade do EGFR no folículo ovariano, cuja sinalização é fundamental para a diferenciação das células do cumulus e na maturação do oócito (EL-HAYEKETAL, 2014). Porém, isoladamente, o FSH é insuficiente para a sinalização funcional do EGFR (SUGIMURA *et al.,* 2015). Portanto, na sequência dos estudos pretende-se testar a adição do FSH à AREG na MIV com a intenção de potencializar a expressão dos EGFR.

Em conclusão, este trabalho inicia o desenvolvimento de um sistema de cultivo para a maturação oocitária *in vitro* mais fisiológico, incluindo uma fase pré-maturação com componentes fisiológicos reguladores da comunicação celular e da maturação nuclear, seguida da indução da cascata ovulatória de forma mais fisiológica com AREG. Nossa intenção é aproximar o sistema de cultivo do processo natural de maturação oocitária, favorecendo a competência oocitária para a fecundação e desenvolvimento. Além disso, esse sistema constitui modelo mais fisiológico para a investigação dos mecanismos de controle de diferentes aspectos da maturação do COC, incluindo a comunicação intercelular, a maturação nuclear e o metabolismo do cumulus. O entendimento desses processos nos ajudará a identificar os pontos vulneráveis

do sistema, assim contribuindo para melhorar a eficiência das tecnologias de reprodução assistida envolvendo a maturação oocitária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EL-HAYEK, S., DEMEESTERE, I., CLARKE, H.J. 2014. Follicle stimulating hormone regulates expression and activity of epidermal growth factor receptor in the murine ovarian follicle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111,16778–16783.

ERICKSON, G.F., WANG, C., HSUEH, A.J. 1979. FSH induction of functional LH receptors in granulosa cells cultured in a chemically defined medium. Nature 279, 336–338.

SUGIMURA, S., RITTER, L. J., ROSE, R. D., THOMPSON, J. G., SMITZ, J., MOTTERSHEAD, D. G., AND GILCHRIST, R. B. 2015. Promotion of EGF receptor signaling improves the quality of low developmental competence oocytes. Dev. Biol. 403, 139–149.