UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - BOTUCATU

EFEITOS E REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO KIT LIGANTE (KL) DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DO COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO BOVINO

PAULA FERNANDA DE LIMA

BOTUCATU – SP
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITOS E REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO KIT LIGANTE (KL) DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DO COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO BOVINO

PAULA FERNANDA DE LIMA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu para obtenção do título de Mestre na área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Buratini Júnior.

BOTUCATU-SP
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ***ROSANGELA APARECIDA LOBO***

Lima, Paula Fernanda de.
Efeitos e regulação da expressão do kit ligante (KL) durante a maturação *in vitro* do complexo cumulus-oócito bovino / Paula Fernanda de Lima. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: José Buratini Júnior
Capes: 50504002

1. Reprodução animal. 2. Bovino – Reprodução. 3. Fertilização in vitro. 4. Biologia – Célula.

Palavras-chave: Bovino; Maturação in vitro; Oócito.

Paula Fernanda de Lima
Botucatu, 2 de Outubro de 2012

Composição da Banca Examinadora

_____
Prof. Dr. José Buratini Jr

_____
Prof. Dr. Ciro Moraes Barros

_____
Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Maria Isabel da Silveira Lima e Paulo Lima

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e Nossa Senhora de Fátima primeiramente

Aos meus amados pais por toda a confiança depositada em mim, pelo grande apoio nos momentos mais difíceis, apenas a família pode dar conforto nesses momentos. Obrigada pelas palavras de incentivo e estarem presentes para podermos dividir os bons momentos. Sem você Minha Mãe e sem você Meu Pai eu não teria conseguido caminhar nem a metade do caminho.

Carinhosamente aos meus queridos e amados irmãos Lucas e Vinícius por sempre me apoiarem e me ajudarem quando precisei, pelos abraços apertados.

Ao Prof. Dr. Carlos H. Cabral Viana que me abriu os olhos para o mundo da pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Buratini Júnior um exemplo de pesquisador a ser seguido, por acreditar na minha capacidade, incentivar, ter paciência comigo nos erros cometidos e principalmente por permitir crescer profissionalmente e intelectualmente.

Ao Prof. Dr. Christopher Price por ampliar discussões dividindo seu conhecimento e pelo incentivo.

Agradeço imensamente a FAPESP pelo apoio financeiro durante todo o mestrado e também no treinamento técnico

Aos colegas e amigos de laboratório Ester, Mariana, Rúbia, Anthony e Diego que estiveram presentes desde o meu estágio no laboratório, por compartilhar seus conhecimentos comigo. Em especial Ester e Mariana por me ajudarem nos experimentos e por permitir a utilização dos bancos de amostras tão preciosas.

As amigas Cinthia, Debora e Fernanda que recentemente integraram o time do lab. Bura por me ajudarem muito nos meus últimos experimentos, por serem pacientes comigo e pela grande amizade e as palavras de conforto, por sempre compartilharmos bons momentos tornando o ambiente de trabalho e a vida mais leve. Obrigada queridas.

A amiga Janete Camargo Teixeira pela amizade e grande carinho durante esses anos

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu, pela colaboração e ajuda técnica e disponibilização de equipamentos.

Ao Prof. Dr. Ciro Moraes Barros em especial pela colaboração no fornecimento de reagentes e disponibilizar seu laboratório sempre.

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia por prontamente disponibilizarem equipamentos e ajuda técnica.

Aos novos amigos Larissa, Tami, Fernando, Klinsmann e José Sérgio pelos ótimos momentos, deixando a vida mais feliz.

Agradecimento mais do que especial ao Paulo Augusto Siqueira.

Deus é a lei e o legislador do Universo
Albert Einsten

RESUMO

LIMA, P.F. **Efeitos e regulação da expressão do kit ligante (KL) durante a maturação *in vitro* do complexo cumulus-oócito bovino.** Botucatu, 2012. p.60 Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista - UNESP.

O desenvolvimento da competência oocitária ocorre de forma gradual durante a foliculogênese e é dependente da interação do oócito com as células do cumulus via fatores parácrinos. O KL é expresso pelas células do cumulus e estimula a maturação nuclear do oócito em roedores, mas suas funções no complexo cumulus-oócito (CCO) bovino não são conhecidas. Neste trabalho, avaliou-se o padrão de expressão do KL, os efeitos do KL sobre a progressão da meiose e a expansão do cumulus, bem como a regulação da expressão do KL por fatores secretados pelo oócito (FSOs; BMP15, FGF8, FGF10, FGF16 e FGF17) durante a maturação in vitro (MIV) de CCOs bovinos. Adicionalmente, os efeitos do KL sobre a expressão de BMP15, GDF9, FGF16 e c-KIT foi avaliada. As isoformas do KL (KL1 e KL2) apresentaram padrões de expressão semelhantes nas células do cumulus ao longo da MIV, com pico de expressão às 12 horas do cultivo. A adição de KL ao cultivo aumentou a porcentagem de oócitos em meiose II e diminuiu a de oócitos em meiose I ao final da MIV, mas não afetou a expansão do cumulus. O FGF8 aumentou a expressão dos RNAm do KL1 e do KL2, enquanto a BMP15 estimulou apenas a expressão do RNAm do KL1. Distintamente, a dose máxima do FGF10 diminuiu a expressão do KL2 às 22 horas do cultivo em estudo dose-resposta, embora o mesmo não tenha sido observado quando uma dose menor, porém efetiva em estimular a expansão do cumulus, foi testada ao longo da MIV (4, 12 e 22 horas). O tratamento com FGF10 e BMP15 associados aumentou a expressão do KL1 às 12 horas do cultivo em relação ao controle e aos fatores de crescimento sozinhos, sugerindo cooperação entre eles na regulação da expressão do KL. A adição de KL ao meio de cultivo não alterou a expressão dos FSOs. Em conjunto, os resultados deste estudo sugerem o envolvimento do KL no controle da maturação nuclear do oócito bovino e que a expressão do KL nas células do cumulus bovinas é regulada por membros das famílias dos FGFs e TGFβs derivados do oócito em cooperação.

Palavras Chave: KL; FGF; BMP15; meiose; maturação *in vitro*; bovinos

ABSTRACT

LIMA, PF **Effects and regulation of the expression of kit ligand (KL) during in vitro maturation of bovine oocyte-cumulus complex**. Botucatu, 2012. p.60 Thesis (MA) - Faculty of Veterinary Medicine - Universidade Estadual Paulista - UNESP.

The development of oocyte competence occurs gradually during folliculogenesis and is dependent on the interaction of the oocyte with cumulus cells via paracrine factors. The KL is expressed by cumulus cells and stimulates oocyte nuclear maturation in rodents, but its functions in cumulus-oocyte complex (COC) cattle are unknown. In this study, we evaluated the expression pattern of KL, the effects of KL on the progression of meiosis and cumulus expansion and regulation of KL expression by factors secreted by the oocyte (OSF; BMP15, FGF8, FGF10, FGF16 and FGF17) during in vitro maturation (IVM) of bovine COCs. Additionally, the effect of KL on the expression of BMP15, GDF9, FGF16 and c-KIT was evaluated. Isoforms of KL (KL1 and KL2) showed similar expression patterns in cumulus cells along the MIV, with higher expression at 12 hours of cultivation. The addition of KL increased the percentage of oocytes in meiosis II and decreased oocyte meiosis I in the end of IVM, but did not affect cumulus expansion. The FGF8 increased expression of KL1 and KL2 mRNA, while only BMP15 stimulated mRNA expression KL1. Distinctly, the maximum dose of FGF10 decreased expression of KL2 at 22 hours of cultivation in dose-response study, although the same was not observed when a lower dose, but effective to stimulate cumulus expansion was tested along MIV (4, 12 and 22 hours). Treatment with FGF10 and BMP15 associated with increased expression of KL1 at 12 hours of culture in relation to the control and growth factors alone, suggesting cooperation between them in the regulation of expression of the KL. The addition of KL to the culture medium did not alter the expression of the FSOs. Taken together, our results suggest the involvement of KL in controlling bovine oocyte nuclear maturation and expression of KL in bovine cumulus cells is regulated by members of the families of FGFs and TGFβs derived oocyte in cooperation

Key words: KL; FGF; BMP15; meiosis; *in vitro* maturation; bovine

LISTA DE FIGURAS

Figura **Página**

CAPÍTULO I

Figura 1: (A) Curva de dissociação do RT-PCR em tempo real. Mostrando dois picos indicativo da presença de dois tamanhos de amplicons, pois a dissociação ocorre em duas temperaturas. (B) Eletroforese em gel de agarose 3%. Mostrando presença da isoforma completa (206 pb) e a isoforma sem exon 3 (122pb), tanto nas células do cumulus maturadas (CC mat) quanto nas células do cumulus imaturas (CC imat). 38

Figura 2: Abundância relativa de RNAm de KL1 e KL2 nas células do cumulus durante o cultivo *in vitro* de CCO por 0 (imaturo), 4, 8, 12, 16 e 22 de maturação (n= 4 réplicas; KL1 p=0.0001; KL2 p=0.0001), letras diferentes representam diferenças significativas. Abundância relativa de RNAm de c-KIT em oócitos durante o cultivo *in vitro* de CCO por 0 (imaturo), 4, 8, 12, 16 e 22 de maturação (n= 4 réplicas; p= 0.4237). Dado é apresentado como média dos valores relativos da amostra calibradora pelo método ΔΔCt com correção da eficiência. Barras com letras diferentes representam diferenças significativas (P<0.05). 39

Figura 3: Grau de expansão das células do cumulus após o cultivo com KL com doses crescentes (0, 10, 50 e 100ng/ml) às 22 horas de cultivo (n=4). Onde Grau1: pouco expandido (p=0.7381); Grau2: expandido (p=0.5823); Grau3: completamente expandido (p= 0.3434). 40

Figura 4: Efeito de crescentes doses de Kit ligante (0, 10, 50 e 100ng/ml) sobre a progressão da meiose em oócitos bovinos cultivados por 22 horas (n=9). O gráfico mostra a porcentagem de oócitos em metáfase 1 (MI; p=0.0069) e metáfase 2 (MII; p=0.0068) após 22 horas de maturação. A proporção de oócitos em MII foi maior na dose de 50ng/ml. Letras diferentes dentro de MI ou MII indicam diferenças significativas (P<0.05). 40

Figura 5: Efeito dos FSO (FGF8, FGF17, FGF16, FGF10 e BMP150) sobre a expressão de KL1 e KL2 em células do cumulus de complexos cumulus-oócito cultivados por 22 horas (n=4/tratamento). Letras diferentes indicam diferenças significativas com p<0.05. Dados são apresentados como a média dos valores (±S.E.M.) relativos a amostra calibradora calculado pelo método de ΔΔCt com correção da eficiência. 41

Figura 6: Efeito de doses crescentes de KL (0, 10, 50 e 100ng/ml) sobre a expressão relativa de RNAm de BMP15, GDF9, c-KIT e FGF16 em oócitos de complexos cumulus-oócito bovino cultivados por 22 horas (n=4). Dados são apresentados como a média dos valores (±S.E.M.) relativos a amostra calibradora calculado pelo método de ΔΔCt com correção da eficiência 42

RESULTADOS COMPLEMENTARES

Figura 1: Efeitos do FGF10, BMP15 e da combinação de ambos sobre a expressão relativa dos RNAm do KL1 e do KL2 em diferentes momentos da MIV.(4, 12 e 22 horas, n=4 por tratamento por momento). Letras diferentes representam diferenças significativas (P<0,05). Dados são apresentados como a média dos valores (±S.E.M.) relativos a amostra calibradora calculado pelo método de ΔΔCt com correção da eficiência.. 46

LISTA DE TABELAS

Tabela **Página**

CAPITULO II

Tabela 1: Sequência dos primers, tamanho dos amplicons, temperatura de anelamento, concentração final do primer e eficiências de amplificação para cada gene avaliado. 37

ABREVIATURAS

ADAM = Família desintegrina e metaloproteinases

ALK = Receptor ativina semelhante a kinase

AMPc = Adenosina monofosfato cíclica

AMPc = Adenosina monofosfato cíclico

ANOVA = Análise de variância

AREG = Ampiregulina

ATP = Adenosina trifosfato

BMP15 = Proteína morfogênica óssea 15

BMPRII = Receptor de BMP do tipo II

BSA = Albumina sérica bovina

CCO = Complexo cumulus-oócito

c-KIT= Receptor celular kit

CO2 = Dióxido de carbono

COX2 = Ciclooxigenase 2

CREB = *cAMP response element binding protein*

CYC-A = Cyclophilin-A

EGF = Fator de crescimento epidermal

EGF-*like* = Fatores de crescimento epidermal (EGF)-*like*

EGFR = Feceptores de EGF

EREG = Epiregulina

FGF = Fatores de crescimento fibroblástico

FIV = Fecundação *in vitro*

FSH = Hormônio folículo estimulante

FSO = Fatores secretados pelo oócito

GAPDH = Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase

GDF9 = Fator de crescimento e diferenciação 9

GDF9 = Growth and differentiation factor 9

GMPc = Monofosfato cíclico de guanosina

H2A = Histona

HAS2 = Hialurona sintetase 2

KL= Kit ligante

KL1= Kit ligante isoforma 1

KL2= Kit ligante isoforma 2

LH = Hormônio luteinizante

MAPK = proteína quinase ativadora de mitógeno

MPF = Fator promotor da maturação

MI = Metáfase 1

MII = Metáfase 2

MIV = maturação *in vitro*

NPPC = Peptídeo natriurético do tipo c

NPR2 = Rceptor do peptídeo natriurético 2

Pb = Pares de base

PBS = *Phosphate buffered saline*

PCR = *polymerase chain reaction*

PDE3A = Fosfodiesterase 3A

PI3K = Fosfatidil inositol 3 quinase

PKA = Proteína quinase A

PTX3 = Pentraxina 3

RNA = ácido ribonucléico

RNAm = ácido ribonucléico mensageiro

RT-PCR = *reverse transcription polymerase chain reaction*

S.E.M. = Erro padrão da média

STRA8 = *stimulated by retinoic acid 8*

TGFβ = fatores de crescimento transformante β

TSG6 = Proteína indutora do fator de necrose tumoral 6

VG = Vesícula germinativa

SUMÁRIO

CAPÍTULO I
1.INTRODUÇÃO---------- 2
2.OBJETIVOS ---------- 4
3.REVISÃO DE LITERATURA---------- 5
3.1.Maturação do complexo cumulus-oócito ---------- 5
3.1.1.Maturação Molecular ---------- 7
3.1.2.Maturação Nuclear---------- 8
3.2.Kit ligante ---------- 10
3.3.Fatores secretados pelo oócito---------- 14
3.3.1.Fatores de cresciemento transformantes β (TGFβ) ---------- 14
3.3.2.Fatores de crescimento fibroblástico (FGFs) ---------- 16

CAPÍTULO II: KIT LIGANTE ESTIMULA O PROGRESSO DA MEIOSE E SUA EXPRESSÃO É ESTIMULADA PELA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA 15 (BMP15) E POR FATORES DE CRESCIMENTO DOS FIBROBLASTOS (FGF) NO COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO BOVINO

RESUMO ---------- 21
SUMMARY ---------- 21
INTRODUÇÃO ---------- 22
MATERIAL E METODO ---------- 23
RESULTADOS ---------- 26
DISCUSSÃO---------- 27
CONCLUSÃO ---------- 31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS---------- 32
TABELA---------- 37
ILUSTRAÇÕES ---------- 38

RESULTADOS COMPLEMENTARES: EFEITO DA INTERAÇÃO ENTRE FGF10 E BMP15 SOBRE A EXPRESSÃO DE KL1 E KL2 EM CÉLULAS DO CUMULUS BOVINAS
1.INTRODUÇÃO---------- 44
2.MATERIAL E METODOS---------- 44
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO---------- 45
4.CONCLUSÃO---------- 46

CONSIDERAÇÕES FINAIS ---------- 47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ---------- 48

CAPÍTULO I

1.INTRODUÇÃO

O aperfeiçoamento das biotécnicas aplicadas à reprodução de bovinos, em especial a maturação e a fertilização *in vitro* (MIV e FIV), desperta grande interesse por proporcionar aumento da produtividade pecuária. Do ponto de vista científico, a espécie bovina constitui modelo valioso para o estudo da fertilidade e para o aperfeiçoamento de protocolos aplicados em humanos, considerando-se as diferenças entre a fisiologia reprodutiva de roedores, tradicionalmente usados como modelo. Ainda assim as taxas de desenvolvimento obtidas com o emprego da MIV e PIV são insatisfatórias quando comparadas com produção *in vivo* (RIZOS et al., 2002), por motivos inerentes ao processo de cultivo, assim o aprimoramento da MIV umas das etapas da FIV é de grande interesse para melhoria dos sistemas de cultivo.

O estudo aprofundado da interação do oócito com as células adjacentes ajudará a compreendermos melhor os requisitos para que o CCO seja habilitado à fertilização e posterior desenvolvimento, fato crucial para a melhoria da eficiência da MIV e também da eficiência reprodutiva da fêmea.

A qualidade do desenvolvimento embrionário depende da diferenciação adequada do CCO. Dessa forma, a perfeita interação entre as células do cumulus e o oócito se faz necessária. O oócito interage com as células do cumulus via secreção de fatores parácrinos (fatores secretados pelo oócito - FSO). Os FSO mais explorados na literatura são dois membros da família dos fatores de crescimento transformante β (TGF-β), a proteína morfogênica óssea 15 (BMP15) e o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9; GILCHRIST et al., 2008; GILCHRIST; RITTER, 2011). Além dos TGF-β, membros da família dos fatores de crescimento dos fibroblastos (FGFs) também são produzidos pelo oócito. Dados de expressão gênica indicam que o FGF8, FGF10, FGF16 e FGF17 estão incluídos dentre os FSO. Os FGFs 10, 16 17 parecem estimular a expansão do cumulus em bovinos e o hormônio folículo estimulante (FSH) estimula a expressão de receptores para FGFs nas células do cumulus, sugerindo que os FGFs estão envolvidos no processo de maturação do CCO bovino (BURATINI et al., 2005; BURATINI et al., 2007; MACHADO et al., 2009; CAIXETA, 2012; MACHADO, 2012).

A regulação da produção dos FSO durante a maturação oocitária não é totalmente conhecida. Um potencial candidato a regulador dos FSO é o kit ligante (KL). Expresso em células da granulosa durante toda a foliculogênese, o KL ativa o receptor c-KIT, presente no oócito (THOMAS; VANDERHYDEN, 2006; HUTT et al., 2006). Em roedores, a BMP15 estimula a expressão do KL, enquanto o GDF9 a inibe. O KL, por sua vez, regula de forma inibitória a expressão da BMP15 em folículos pré-antrais e antrais iniciais em camundongos (EPPIG, 2001; THOMAS; VANDERHYDEN, 2006; HUTT et al., 2006). A participação do KL na regulação da maturação do CCO é pouco conhecida, mas sabe-se que ele estimula a maturação nuclear em camundongos (KIDDER; VANDERHYDEN, 2010; YE et al., 2009).

Este trabalho avaliou o padrão de expressão do KL ao longo da MIV, bem como seus efeitos sobre a expansão do cumulus e progresso da meiose. Além disso, investigou-se a interação entre o KL e os principais FSOs expressos no CCO bovino por meio da avaliação dos efeitos dos FSOs sobre a expressão do KL nas células do cumulus, bem como dos efeitos do KL sobre a expressão dos FSOs (BMP15, GDF9, FGF16) e receptor c-KIT**.** Adicionalmente foi avaliado a interação do FGF10 e BMP15 sobre a expressão de KL nas células do cumulus.

2.OBJETIVOS

Geral

Este estudo objetivou avaliar a interação parácrina entre os sistemas KL/c-KIT, FGF e TGF-β na regulação da diferenciação do oócito e das células do cumulus, utilizando a MIV em bovinos como modelo.

Específicos

1-Identificar as isoformas de KL e seu padrão de expressão nas células do cumulus.
2-Testar o seu efeito sobre a expansão das células do cumulus e progressão da meiose nos oócitos bovinos
3-Avaliar a regulação da expressão dos fatores secretados pelo oócito pelo KL.
4-Avaliar a regulação da expressão de ambas isoformas de KL pelos fatores secretados pelo oócito, bem como a combinação de FGF10 e BMP15

3.REVISÃO DE LITERATURA

3.1.Maturação do complexo cumulus-oócito

A capacidade de desenvolvimento embrionário depende do potencial de desenvolvimento do oócito. A maturação *in vitro* (MIV) é uma etapa crítica para a produção de embriões *in vitro* para fins comerciais ou de pesquisa. Uma vez que oócitos maturados *in vivo* são mais competentes do que oócitos maturados *in vitro*, é extremamente importante *a*mpliar os conhecimentos sobre os eventos e mecanismos que ocorrem durante a maturação do complexo cumulus-oócito, para o aperfeiçoamento das condições de cultivo e estabelecimento de estratégias para a melhoria do sistema de MIV (DE PRADA et al., 2009).

A maturação oocitária envolve diversas fases e eventos complexos que permitem que o oócito desenvolva seu potencial intrínseco de desenvolvimento.

Em ovários de fetos de camundongos a iniciação do programa meiótico é dependente da sinalização do ácido retinóico, um derivado da vitamina A, que estimula o gene "*stimulated by retinoic acid 8*" (STRA8). O STRA8 é um fator citoplasmático expresso nas células germinativas da fêmea pouco antes do início da prófase da primeira divisão meiótica em resposta ao acido retinóico. Nas fêmeas, o STRA8 é necessário para replicação pré-meiótica de DNA, assim como para eventos da prófase como a condensação cromossômica, coesão, sinapse e recombinação (KOUBOVA et al., 2006; BALTUS et al., 2006; BOWLES et al., 2006; SANCHEZ et al., 2012).

O desenvolvimento da competência oocitária ocorre durante o desenvolvimento folicular, quando a meiose oocitária encontra-se bloqueada na prófase I e o oócito aumenta em diâmetro. Em folículos primordiais, os oócitos têm aproximadamente 29 µm de diâmetro e crescem até 31 µm em folículos primários. Ainda na fase pré-antral, o oócito atinge 68 µm de diâmetro e inicia-se a formação da zona pelúcida e a diferenciação das células do cumulus. No folículo antral, o oócito atinge seu diâmetro final de 110-120 µm e competência para retomada da meiose (FORTUNE, 2003; SCARAMUZZI et al., 2011; OTOI et al., 1997).

O progresso da meiose é interrompido após a formação dos folículos. Os oócitos de mamíferos encontram-se no estágio de prófase I ao nascimento, chamado de estágio de vesícula germinativa. Os oócitos permanecem nesse estágio até a puberdade, quando o estímulo gonadotrópico pré ovulatório leva à retomada da meiose com rompimento da vesícula germinativa (RVG; SCHATTEN; SUN, 2011).

Após o rompimento da vesícula germinativa, os oócitos iniciam a metáfase I (MI) com a formação do fuso meiótico e o alinhamento dos cromossomos no centro do fuso. Em seguida, ocorre a anáfase I, com a separação dos cromossomos homólogos, seguida pela telófase I com a extrusão do primeiro corpúsculo polar. O oócito prossegue para a metáfase II, com formação do segundo fuso meiótico e alinhamento dos cromossomos. A metáfase II perdura até a penetração do oócito pelo espermatozóide, quando a anáfase II, com a separação das cromátides irmãs, e telófase II se sucedem rapidamente e ocorre a extrusão do segundo corpúsculo polar (MEINECKE et al., 2001).

A divisão meiótica em mamíferos, especificamente em bovinos, é assimétrica e essa assimetria garante que ocorra a divisão dos cromossomos (telófase I) e das cromátides (telófase II) sem grande perda do material citoplasmático (LI et al., 2005).

O longo processo de maturação oocitária permite que os oócitos adquiram competência para sustentar os estágios subsequentes de desenvolvimento. A maturação oocitária envolve complexos eventos de maturação nuclear (segregação cromossomal) e citoplasmática, referente à reorganização das organelas, mudanças no citoesqueleto e maturação molecular (FERREIRA et al., 2009).

Os oócitos maturados *in vitro* são menos competentes do que os maturados *in vivo.* Em macacas, o remodelamento da actina, microtubulos, tubulinas transzonais e o tempo de maturação nuclear diferem entre maturação *in vitro* e maturação *in vivo* (DE PRADA et al. 2009). Inúmeros são os fatores e vias ativadas no oócito e células do cumulus durante a maturação.

3.1.1.Maturação Molecular

A maturação molecular corresponde ao processo de transcrição, acúmulo e processamento de RNAm que será traduzido em proteínas fundamentais aos eventos relacionados à maturação (GOTTARDI; MINGOTI, 2010). Assim, um estoque de RNAm é feito antes da retomada da meiose, já que, supostamente, não existe atividade transcricional durante a maturação (SIRARD, 2001). Contudo, dados mais recentes mostram que pode haver transcrição de determinados genes durante a maturação *in vitro* de oócitos. Em oócitos bovinos, observou-se que o GDF9 e a ciclina B1 são mais expressos no estágio de MII do que em VG (MAMO et al., 2011; REGASSA et al., 2011).

O RNAm presente no oócito está estável e transitoriamente inativo. A ativação da tradução do RNAm ocorre por poliadenilação, adição de adenina na porção terminal 3' do RNAm, que estimula a liberação de moléculas repressoras ligadas na porção 5'. O elemento de poliadenilação citoplasmática (CPE) se liga de forma repressiva e específica ao RNAm para reconhecimento do sítio de início da poliadenilação. Após a fosforilação e ativação da via Auroa-A-CPEB, a poliadenilação e a tradução são iniciadas. A porção final 5' possui um *cap*, que se liga ao complexo eIF-4F da subunidade menor do ribossomo, que estimula o início da tradução (TOMEK et al., 2002; MENDEZ; RICHTER, 2001).

Em oócitos bovinos maturados *in vitro,* a tradução é aumentada com o rompimento da vesícula germinativa, acompanhada da poliadenilação de RNAm e queda na transcrição. Ao iniciar-se a MII, a síntese proteica é reduzida (TOMEK et al., 2002).

Dentre as proteínas sintetizadas durante o processo de maturação, destaca-se o fator promotor da maturação (MPF), responsável pela retomada da meiose. O MPF é um heterodímero que consiste de duas subunidades: a ciclina B1 ou CDKI e a subunidade $p34^{cdc2}$ (GONÇALVES et al., 2008). Após a tradução, a $p34^{cdc2}$ se une a ciclina B1 e ambas são desfosforiladas pela fosfatase CDC25 para que o MPF se torne ativo. O MPF tem atividade máxima na MI, seguida de queda e restauração da atividade na MII (GONÇALVES et al., 2008).

3.1.2.Maturação Nuclear

A interação entre as células do cumulus e o oócito é fundamental para a maturação nuclear. Em bovinos, o bloqueio dessa conexão gera perfis diferenciados de expressão gênica nos dois tipos celulares, podendo afetar a maturação molecular e nuclear (REGASSA et al., 2011).

A comunicação entre o oócito e as células do cumulus pode se dar por sinalização parácrina (GILCHRIST et al., 2008) ou por junções do tipo *gap*, que permitem o transporte bidirecional de íons, metabólitos, aminoácidos e pequenas moléculas reguladoras (BUCCIONE et al., 1990; ALBERTINI et al., 2001). As *gap junctions* são hexâmeros de proteínas chamadas conexinas. Cada conexina possui quatro domínios transmembrana, formando canais que permitem a troca de moléculas (<1 kDa) entre as células (KIDDER; MHAWI, 2002). As *gap junctions* entre as células do cumulus (conexina 43) e entre as células do cumulus e o oócito (conexina 37). A falta de conexina compromete o desenvolvimento folicular e a maturação oocitária (NUTTINCK et al., 2000; TEILMANN, 2005).

Para o oócito se manter em VG é necessário que o AMPc se mantenha alto e notavelmente a interação entre as células do cumulus e o oócito também parece contribuir para a parada meiótica. Existem duas formas de manter o AMPc alto dentro do oócito. A primeira é pela produção local e pelo transporte de AMPc das células do cumulus para o oócito e a segunda é pela ação do GMPc, produzido pelas células do cumulus e conduzido através das *gap junctions* ao oócito, que inibe a atividade da fosfodiesterase 3A (PDE3A) que degrada o AMPc no oócito (WEBB et al., 2002; CONTI et al., 2002; ZHANG et al., 2009). Os altos níveis de AMPc ativam a PKAI presente no oócito impedindo a progressão da meiose (DOWNS; HUNZICKER-DUNN, 1995).

O oócito estimula a expressão do receptor do peptídeo natriurético 2 nas células do cumulus (NPR2; SANCHÉZ et al., 2012). O NPR2 é ativado pelo seu ligante, o precursor do peptídeo natriurético do tipo c (NPPC), que estimula a produção de GMPc que se difunde no oócito e inibe a atividade da PDE3A mantendo a meiose bloqueda (ZHANG, M. et al., 2010). De acordo com Zhang et al. (2011), o estradiol promove e mantém a expressão de NPR2 nas células do cumulus, o que é importante para que os oócitos de camundongos

permaneçam na parada meiótica. Além disso, Robinson et al. (2012) demonstraram que o LH reduz a atividade do NPR2, contribuindo para a redução dos níveis de GMPc e permitindo a retomada da meiose em oócitos de camundongos.

A retomada da meiose (rompimento da vesícula germinativa) ocorre em resposta às gonadotrofinas (FSH *in vitro* e LH *in vivo*) que levam à diminuição dos níveis de AMPc no oócito (SELA-ABRAMOVICH et al., 2005). Supõe-se que o aumento transitório do AMPc nas células do cumulus leve à ativação da PDE3A e da PKAII ocorrendo expansão das células do cumulus e retomada da meiose (DOWNS; HUNZICKER-DUNN, 1995). A PKAII ativada pelo AMPc leva ao aumento do CREB (*cAMP response element binding protein*), regulador da transcrição de genes como os EGF-like nas células do cumulus (ZHANG et al., 2009). Os fatores EGF-like se ligam a seus receptores EGFR, ativando a expressão de genes reguladores da expansão das células do cumulus. A ativação da cascata MAPK também leva a uma redução nos níveis de AMPc do oócito por fosforilação de conexinas e interrupção da comunição célula-célula, o que ativa o MPF que promove a retomada da meiose (SELA-ABRAMOVICH et al., 2005)

Estudos *in vitro* mostraram que o FSH ativa a MAPK nas células do cumulus, que pode ser difundida via *gap junctions* para o oócito (REGASSA et al., 2011). A ativação do MPF também ocorre no oócito via proteína MOS, capaz de ativar a via da MAPK, que modula a ação do MPF conforme descrito acima. A ativação quase simultânea da MAPK e MPF é importante para o sucesso da meiose. Em bovinos a ativação do MPF e MAPK ocorre de 9 a 12 horas de cultivo *in vitro* (FERREIRA et al., 2009; REGASSA et al., 2011). A ativação da MAPK pelo FSH nas células do cumulus pode ser indireta e mediada por fatores EGF-like e FGFs uma vez que o FSH estimula a expressão da AREG, EREG e FGFRs nas células do cumulus (CAIXETA et al., 2012)

O MPF induz o RVG, a retomada da meiose, com condensação parcial dos cromossomos e ainda ativa as vias da MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos) e RhoA. A MAPK regula a condensação cromossômica e organização dos microtúbulos para formação do fuso meiótico, além de recrutar filamentos de actina e miosina. A RhoA faz o recrutamento apenas de miosina.

Ambos os fatores ativados pelo MPF ativam a contração do anel de actina/miosina formado próximo ao fuso meiótico, levando à extrusão do primeiro corpúsculo polar, conforme descrito em rãs e ovelhas (KOTANI; YAMASHITA, 2002; WU et al., 2010). Falhas na ativação da MAPK ou do RhoA, prejudicam o alinhamento e a separação cromossômica (KOTANI; YAMASHITA, 2002).

A divisão dos cromossomos e das cromátides ligadas ao fuso é assimétrica do citoplasma, permitindo que uma maior quantidade de citoplasma permaneça no oócito e não vá para os corpúsculos polares. Além dos microtúbulos e microfilamentos, o centrossomo está envolvido nessa divisão meiótica (LI et al., 2005; SCHATTEN; SUN, 2011). O centrossomo é composto por três proteínas: γ-tubulina, pericentrina e NuMA, que permitem a correta formação do fuso meiótico. Durante o RVG, as proteínas centrossomais devem primeiramente se organizar para a formação do fuso meiótico central, que posteriormente migra para o córtex oocitário. A arranjo correto do fuso é importante para a correta separação cromossômica durante as duas divisões meióticas (AI et al*.,* 2009; SHATTEN; SUN, 2011).

3.2.Kit Ligante

O KL, também conhecido como stem cell factor (SCF), steel factor (SF) e mast cell growth factor (MCGF), é um fator de crescimento pluripotente importante na diferenciação, crescimento e sobrevivência de diversos tipos celulares, incluindo células hematopoiéticas, melanócitos e células germinativas primordiais. O KL se liga ao seu receptor c-KIT, presente nas células da teca e oócito, que ativa várias cascatas de sinalização, descritas abaixo (REYNAUD e DRIANCOURT et al*.,* 2000; REYNAUD et al*.,* 2001; HUTT et al*.,* 2006ab).

O KL, gera por “splicing” alternativo dois transcritos que são traduzidos em duas proteínas ligadas à membrana denominadas KL1 e KL2 (HUANG et al., 1992). O KL1 pode ser rapidamente clivado originando um fator de crescimento solúvel. A região de clivagem é codificada pelo exon 6 em comundongos, que corresponde ao exon 3 no bovino. Ao contrário do KL1, o KL2 não possui essa região de clivagem por deleção do exon 6 e é processado

proteoliticamente de forma menos eficiente (HUANG et al., 1992; ZHOU et al., 1994).

O processamento proteolítico de proteínas transmembrânicas para liberação do domínio extracelular é chamado de "*ectodomain shedding*" e tem sido tratado como um importante mecanismo de regulação pós-transcricional. Uma variedade de proteínas de superfície passa por processamento proteolítico (KAWAGUCHI et al., 2007) incluindo o fator de necrose tumoral (TNF; SCHLÖNDORFF; BLOBEL, 1999). fatores de crescimento como fator de cresciemento transformante (TGF; HOOPER et al., 1997) e o fator de crescimetno epidermal (EGF; BLOBEL, 2005).

Os mecanismos responsáveis pelo processamento do KL ainda não são completamente entendidos (KAWAGUCHI et al., 2007). Alguns estudos indicam que o KL1 pode ser clivado por uma série de proteases como a matrix metaloproteinase 9 (MMP9; Heissig et al., 2002), quinase de mastócitos (Longley et al., 1997) e vários membros da família das desintegrinas metaloproteinases (ADAMs), como a ADAM8, ADAM9 (AMOUR et al., 2002), ADAM17 e ADAM19 (KAWAGUCHI et al. 2007). De acordo com Kawaguchi et al. (2007), a ADAM 17 é a única protease conhecida capaz de clivar KL2.

Ambos os fatores, KL1 e KL2, são biologicamente ativos *in vivo.* A supressão da expressão do KL1 leva a deficiências em melanócitos, anemia severa e infertilidade (BRANNAN et al, 1991). ,Em camundongos que expressam exclusivamente o KL2, deficiências leves na hematopoiese e desenvolvimento de mastócitos sao observadas (TAJIMA et al., 1998).

O KL2 é mais efetivo em promover o crescimento oocitário do que o KL1 (THOMAS et al*.,* 2008). Como animais que exclusivamente produzem KL2 são férteis, sugere-se que o KL2 possa ser a principal isoforma para desenvolvimento oocitário (TAJIMA et al., 1998; KIDDER; VANDERHYDEN, 2010). Embora as duas isoformas possuam a mesma afinidade pelo receptor c-KIT, o KL2 induz ativação mais persistente desse receptor (FLANAGAN; LEDER 1990; MIYAZAWA et al. 1995).

Ambos os transcritos, KL1 e KL2, estão presentes no ovário bovino (ZHOU et al., 1994). No folículo ovariano, o RNAm do KL é expresso nas células da granulosa durante todo o desenvolvimento folicular. Os níveis de RNAm de ambas isoformas são mais altos nas células da granulosa de

folículos pré-antrais do que em antrais, mas na fase pré-ovulatória ocorre dramático aumento da expressão de KL1 nas células da granulosa murais (JOYCE et al*.,* 1999).

O KL está envolvido na ativação de folículos primordiais tanto em ratos como em bovinos (PARROTT; SKINNER, 1998; PARROTT; SKINNER, 1999). A ativação do folículo primordial em folículo primário é dependente da interação entre as células mesenquimais e epiteliais, que darão origem as células da teca e células da granulosa respectivamente. Essa interação promove a mudança das células da granulosa de escamosa para cuboidal, recrutamento das células da teca e subsequente proliferação das células da granulosa e teca e crescimento oocitário (LINTERN-MOORE; MOORE, 1979; PARROTT; SKINNER, 2000; FORTUNE, 2003, SKINNER, 2005; KEZELE et al 2005). Neste contexto, demonstrou-se tanto em ratos como em bovinos, que o FGF-7 produzido por células do estroma ao redor de folículos primários (pré-teca) estimula a expressão de KL nas células da granulosa, que por sua vez promove o recrutamento das células da teca e incrementa a expressão FGF-7 nesse tipo celular em bovinos (PARROT; SKINNER, 1998; 2000; KEZELE et al., 2005).

A expressão do KL é regulada por alguns fatores ao longo do desenvolvimento folicular. O FSH estimula a expressão de KL, em células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais em roedores (JOYCE et al*.,* 1999; Driancourt et al., 2000).

Outros fatores que influenciam a expressão de KL são o GDF9 e a BMP15, ambos secretados pelo oócito. O GDF9 regula negativamente a expressão de KL nas células da granulosa de folículos pré-antrais de roedores (ELVIN et al*.,* 1999; JOYCE et al*.,* 2000; THOMAS e VANDERHYDEN, 2006). Já a BMP15 estimula a expressão de KL, que, por sua vez, inibe a expressão de BMP15 em folículos pré-antrais em camundongos (YAN et al*.* 2001; THOMAS et al*.,* 2005; THOMAS e VANDERHYDEN, 2006).

Poucos estudos exploraram a ação do KL em oócitos. O KL estimulou o crescimento e a sobrevivência do oócito, bem como a extrusão do primeiro corpúsculo polar durante a MIV em roedores (PACKER et al*.,* 1994; ISMAIL et al*.,* 1997; THOMAS et al*.,* 2008; YE et al*.,* 2009). O KL também parece estar envolvido na sobrevivência oocitária de folículos pré-antrais via incremento na

expressão de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Bcl-xL e redução na expressão do fator pró-apoptótico Bax em ratos (JIN et al*.,* 2004).

O co-cultivo de oócitos desnudos com fibroblastos produtores de KL2 revelou a capacidade do KL2 em aumentar a expressão de c-KIT e o diâmetro do oócito, além de impedir a quebra espontânea da vesícula germinativa em murinos (THOMAS et al*.,* 2008). O KL atrasou a quebra da vesícula germinativa mas não bloqueou a meiose em oócitos de ratos cultivados (ISMAIL et al*.,* 1997; ISMAIL et al., 1996). Em contraste, o KL aumentou a taxa de extrusão do primeiro corpúsculo polar e a síntese de RNAm da ciclina B1, que é a subunidade reguladora da maturação e indutora da meiose, em oócitos desnudos de camundongos submetidos à MIV (YE et al*.,* 2009).

A interação do KL com o sistema FGF já foi apontada na literatura. O FGF7 estimulou a expressão do KL em CCOs bovinos co-cultivados com células da granulosa (CHO et al*.,* 2008). Por outro lado, o KL aumentou a expressão do FGF8 e GDF9 e reduziu a expressão de BMP15 no oócito de ratas (MIYOSHI et al*.,* 2012).

-Sinalização c-KIT

O KL, ao se ligar ao seu receptor tirosina quinase, o c-KIT, desencadeia sua dimerização e ativação de vias de sinalização relacionadas com proliferação celular, ativação do ciclo celular, migração, diferenciação, crescimento e sobrevivência celular (MERKWITZ et al., 2011). O KL pode ativar várias vias de sinalização como JAK/STAT e MAPK/Ras/Raf, mas a mais importante parece ser a via fosfatidilinositol-3 quinase (PI-3K), que leva à ativação da Akt (proteína quinase B). Com a ativação da Akt ocorre inativação do FOXO3a, um fator de transcrição que media apoptose, parada do ciclo celular e inibe a produção de BMP15 e das conexinas 37 e 43. A Akt também está envolvida na ativação do ciclo celular por estimular a transição tanto da fase G1 para a fase S, quanto da fase G2 para a fase M. Na transição G1/S ocorre ativação de vários fatores como a ciclina D e a ciclina E, enquanto que na transição G2/M ocorre ativação da ciclina B e do fator CDC25, ambos envolvidos na ativação do MPF (LIU et al., 2006; LIM et al., 2010; MERKWITZ et al., 2011; XU et al., 2012).

3.3.Fatores secretados pelo oócito

O oócito influencia fortemente o crescimento folicular e sua própria diferenciação pela produção e secreção de fatores que atuam nas células da granulosa de forma parácrina (OTSUKA et al*.,* 2011). Dentre os fatores secretados pelo oócito destacam-se a BMP15 e GDF9, ambos da família TGFβ, e membros da família dos fatores de crescimento dos fibroblastos (SUGIURA et al 2007, ZHANG, K. et al., 2010)

3.3.1.Fatores de crescimento transformantes β (TGFβ)

Dentre os membros desta superfamília, o GDF9 e a BMP15 têm recebido atenção especial por terem sido inicialmente descritos como fatores expressos exclusivamente nos oócitos em bovinos e ovinos (BODENSTEINER et al*.,* 1999; JUENGEL et al*.,* 2004). Entretanto, dados mais recentes sugerem que os RNAm do GDF9 e BMP15 estão presentes nas células do cumulus de bovinos. Além disso, esses dois fatores se mostraram diferentemente expressos em vacas adultas e novilhas, que apresentaram menor quantidade de RNAm tanto para o GDF9 quanto para a BMP15. Esse diferente padrão de expressão foi associado a uma menor competência para o desenvolvimento em oócitos de novilhas (HOSOE et al*.,* 2011).Em contraste Crawford e McNatty (2012) não encontraram expressão de GDF9 e BMP15 nas células do cumulus de bovinos.

Os TGFβ participam da regulação parácrina da maturação oocitária e da diferenciação das células do cumulus e das células da granulosa, além de serem essenciais para o desenvolvimento normal de folículos pré-antrais e antrais (LI et al*.,* 2000; JUENGEL e MCNATTY, 2005). São importantes reguladores da proliferação, esteroidogênese, apoptose e expansão das células do cumulus e favorecem a competência do oócito para a fecundação e desenvolvimento embrionário (EPPIG, 2001; GILCHRIST et al*.,* 2004; JUENGEL et al*.,* 2004; HUSSEIN et al*.,* 2006). Em bovinos, os RNAm do GDF9 e BMP15 são expressos pelo oócito durante toda a MIV sem variações significativas (CAIXETA, 2012).

As ações dos TGFβ ocorrem por meio da ativação de diferentes receptores. O GDF9 ativa o receptor ALK5 e a BMP15, o receptor ALK6. Contudo, ambos os fatores ativam o receptor comum BMPRII, que deve formar dímeros com os receptores específicos supracitados a fim de desencadear resposta intracelular mediada pelas SMADs (VITT et al*.,* 2002; SHIMASAKI et al*.,* 2004; KNIGHT; GLISTER, 2006).

A expressão alterada ou bloqueada do GDF9 e da BMP15 altera a função ovariana e a fertilidade (MCNATTY et al*.,* 2004; GILCHRIST et al*.,* 2004). Camundongos com deficiência na produção de GDF9 têm a foliculogênese bloqueada, demonstrando a função essencial do GDF9 para o desenvolvimento do folículo (DONG et al*.,* 1996). Em camundongos, células do cumulus cultivadas com oócitos em que a expressão do GDF9 foi suprimida apresentam pequena evidência morfológica de expansão e reduzidos níveis de expressão da HAS2, o que sugere produção diminuída de hialurona, o componente predominante da matriz ao redor das células do cumulus expandidas (GUI; JOYCE, 2005).

A adição de GDF9 no cultivo de células foliculares de ratos aumentou a síntese do RNAm da cicloxigenase 2 (COX 2), da HAS2 e da proteína de regulação aguda da esteroidogênese (StAR), enquanto reduziu a síntese de receptores de LH nas células da granulosa de camundongos (ELVIN et al*.,* 1999).

A BMP15, além de participar da regulação da foliculogênese pré-antral (VAN DEN HURK et al*.,* 1997), está envolvida na maturação final do folículo e ovulação (YAN et al. 2001; revisado por MCNATTY et al*.,* 2004). Camundongos com deleção da BMP15 apresentam número reduzido de oócitos fertilizados após o acasalamento (YAN et al*.,* 2001 revisado por SU et al*.,* 2004). A administração de BMP15 exógena melhora a competência para o desenvolvimento do oócito e a subsequente qualidade embrionária em bovinos (HUSSEIN et al*.,* 2006). Durante a maturação de CCO em bovinos, a BMP15, além de melhorar a expansão, aumentou a expressão de genes reguladores desse processo como a ADAM10 e a ADAM 17, responsáveis por clivar fatores EGF-*like* presos à membrana citoplasmática (HSIEH; CONTI, 2005), a AREG e a EREG, que são fatores EGF-*like,* e genes diretamente associados à expansão como a HAS2, a COX2, a pentraxina (PTX3) e a proteína indutora do

fator de necrose tumoral 6 (TSG6; CAIXETA, 2012). O efeito positivo da BMP15 sobre a expansão das células do cumulus também foi reportada em camundongos (YOSHINO et al*.,* 2006).

3.3.2. Fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs)

Em mamíferos, os FGFs compõem uma família de pelo menos 22 membros (ZHANG et al., 2006). Os FGFs são classificados em sete subfamílias de acordo com análises filogenéticas: sub-famílias do FGF1, FGF4, FGF7, FGF8, FGF9, iFGF e hFGF, (ITOH; ORNITZ, 2004). Os receptores de FGFs são do tipo tirosina quinase e são codificados por quatro genes diferentes (FGFR-1 - 4). Transcritos alternativos do FGFR-1, FGFR-2 e FGFR-3 levam à tradução de isoformas funcionalmente distintas (“B” e “C”) que apresentam diferentes graus de afinidade pelos diversos FGFs (CHELLAIAH et al., 1994; ORNITZ et al., 1996). Os FGFs estão presentes durante toda a vida, atuando no crescimento e diferenciação celular do desenvolvimento embrionário até a vida adulta (IGARASHI et al., 1998).

Os FGFs estão envolvidos no controle da oogênese, foliculogênese e, maturação do complexo cumulus-oócito. O bloqueio dos receptores de FGFs prejudicou as taxas de fertilização e de desenvolvimento embrionário em vacas (ZHANG; EALY; 2012). O FSH, que sabidamente induz a maturação do CCO i*n vitro*, estimula a expressão de FGFRs e do sistema EGF-like nas células do cumulus (ZHANG; EALY; 2012; CAIXETA, 2012).

FGF10

O FGF10, também conhecido como KGFII (fator de crescimento dos queratinócitos II), pertence à subfamília do FGF7 (FGFs 3, 7, 10 e 22), cujos membros interagem com dois principais receptores, o FGFR-2b e o FGFR-1b (ITOH; ORNITZ, 2004; ZHANG et al*.,* 2006). O FGF10 é expresso no oócito e nas células da teca em folículos antrais bovinos. Sua expressão é menor em folículos estrogênicos e tem a capacidade de inibir a esteroidogênese em células da granulosa (BURATINI et al*.,* 2007). O FGF10 aumentou a expressão da BMP15 nas células do cumulus, o número de oócitos em MII e a produção

de blastocistos em bovinos (ZHANG, K. et al*.,* 2010). Os receptores para o FGF10 estão expressos nas células da granulosa murais (BERISHA et al., 2004) e do cumulus (CHO et al., 2008; ZHANG, K. et al., 2010), sendo que a expressão do FGFR-1b é estimulada pelo FSH e pela BMP15 (ZHANG; EALY 2012; CAIXETA, 2012).

A expressão do FGF10 foi detectada em oócitos bovinos imaturos, maturados *in vivo* e ao longo da maturação *in vitro* (CAIXETA, 2010). Resultados recentes do nosso grupo sugerem que o FGF10 se mantém expresso no oócito ao longo da maturação do CCO e potencializa a expansão das células do cumulus. O FGF10 aumentou a expressão de genes relacionados com a expansão como a COX2 (do início ao final da maturação), a PTX3 (a partir das 12 horas de cultivo) e a TSG6 (no final da maturação; CAIXETA, 2012).

FGF17 e FGF8

Os FGFs 8, 17 e 18 compõem a subfamília FGF8, conhecida como família oncogênica fetal (NEZU et al*.,* 2005) e compartilham os mesmos receptores: FGFR-3c, FGFR-4 e FGFR-2c (ITOH; ORNITZ, 2004; BURATINI et al*.,* 2005; BERISHA et al. 2004). O RNAm do FGFR-3c foi encontrado em células da teca e da granulosa, enquanto que o FGFR-4 mostrou-se presente apenas nas células da teca (BURATINI et al*.,* 2005). Mais recentemente, a expressão do RNAm do FGFR-2c e 3c foi detectada nas células do cumulus bovinas (ZHANG; EALY 2012; CAIXETA, 2012 ; MACHADO, 2012)

A expressão do FGF17 foi detectada em maiores níveis no oócito, embora também tenha se mostrado presente em células da teca e da granulosa de folículos antrais bovinos (MACHADO et al. 2009). A expressão do FGF17 foi suprimida durante a maturação do CCO e a adição de FGF17 ao meio de cultivo estimulou a expansão do cumulus (MACHADO, 2012).

A expressão do FGF8 também foi detectada em oócitos bovinos e de roedores (BURATINI et al. 2005; SUGIURA et al*.,* 2010). O FGF8 suprimiu a esteroidogênese em células da granulosa de ratos (MYIOSHI et al*.,* 2010). Além disso, o FGF8 e a BMP15, ambos derivados do oócito, atuam em sinergismo estimulando a expressão e atividade de enzimas glicolíticas nas

células do cumulus de camundongos (SUGIURA et al*.,* 2007). Zhang, M. et al. (2010) demonstraram que o FGF8 em combinação com BMP15 ou GDF9 eleva a expressão de NPR2 em células do cumulus de CCOs murinos oocectomizados, sugerindo o envolvimento do FGF8 na maturação nuclear.

FGF16

O FGF16 é membro da subfamília do FGF9. Os membros dessa subfamília (FGF9, FGF16 e FGF20) ativam os receptores FGFR-3c, FGFR-2c, FGFR-1c, FGFR-3b e FGFR-4 (ITOH; ORNITZ, 2004; ZHANG et al*.,* 2006). A expressão do FGF16 foi observada em células da granulosa, células da teca e oócitos. A presença do RNAm do FGF16 foi detectada em oócitos imaturos e maturados e se manteve constante ao longo da maturação *in* vitro (MACHADO, 2012). Esses resultados sugerem os oócitos como principal sítio de expressão do FGF16 em folículos antrais bovinos.

Uma vez que o FGF16 ativa os mesmo receptores que o FGF8 (ITOH; ORNITZ, 2004), seus efeitos podem ser similares. O FGF16 potencializou a expansão das células do cumulus em bovinos (MACHADO, 2012), mas sua interação com a BMP15 ainda não foi pesquisada.

.

CAPÍTULO II

Kit ligante estimula o progresso da meiose e sua expressão é estimulada pela proteína morfogenética óssea 15 (BMP15) e por fatores de crescimento dos fibroblastos (FGF) no complexo cumulus-oócito bovino

O presente artigo encontra-se de acordo com as normas de submissão exigidas pelo periódico *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, exceto a apresentação das referências bibliográficas

Kit ligante estimula o progresso da meiose e sua expressão é estimulada pela proteína morfogenética óssea 15 (BMP15) e por fatores de crescimento dos fibroblastos (FGF) no complexo cumulus-oócito bovino.

Paula Fernanda de Lima[1*]

Ester Siqueira Caixeta[2]

Mariana Fernandes Machado[2]

Cinthia Marenza Ormond[2]

Christopher Price[3]

José Buratini[2]

[1] Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 18618-970, Brasil.

[2] Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rubião Junior, Botucatu, São Paulo, 18618-970, Brasil.

[3] Centre de Recherche en Reproduction Animale, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Quebec J2S 7C6, Canada.

*Correspondência: Paula Fernanda de Lima. Laboratório de Fisiologia Molecular Ovariana, Departamento de Fisiologia - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP-Botucatu. Distrito de Rubião Junior, sem número. CEP:18618-970.

Resumo

Fatores secretados pelo oócito (FSO) e pelas células do cumulus regulam a diferenciação do complexo cumulus-oócito. O KL é expresso pelas células do cumulus e estimula a maturação nuclear do oócito em roedores, mas suas funções no complexo cumulus-oócito (CCO) bovino não são conhecidas. Neste estudo, utilizando-se como modelo a maturação *in vitro* (MIV) do CCO bovino, as seguintes hipóteses foram testadas: 1- ambas as isoformas do KL (KL1 e KL2) estão expressas nas células do cumulus e os níveis dos RNAm são regulados ao longo do cultivo; 2- o KL estimula a maturação nuclear e a expansão do cumulus; 3- fatores secretados pelo oócito (BMP15, FGF8, FGF10, FGF16 e FGF17) regulam a expressão dos RNAm do KL nas células do cumulus; 4- o KL regula a expressão dos RNAm da BMP15, GDF9, FGF16 e c-KIT no oócito. As isoformas do KL (KL1 e KL2) apresentaram padrões de expressão semelhantes nas células do cumulus ao longo da MIV, com pico de expressão às 12 horas do cultivo. A adição de KL ao cultivo aumentou a porcentagem de oócitos em meiose II e diminuiu a de oócitos em meiose I ao final da MIV, mas não afetou a expansão do cumulus. O FGF8 aumentou a expressão dos RNAm do KL1 e do KL2, enquanto a BMP15 estimulou apenas a expressão do RNAm do KL1. Distintamente, o FGF10 diminuiu a expressão do KL2. O FGF17 e o FGF16 não alteraram a expressão do KL nas células do cumulus e o KL não alterou a expressão dos FSOs investigados. Em conjunto, os resultados deste estudo sugerem o envolvimento do KL no controle da maturação nuclear do oócito bovino e que a expressão do KL nas células do cumulus bovinas é regulada por membros das famílias dos FGFs e TGFβs.

Unitermos: KL; FGF; BMP15; meiose; maturação *in vitro*; bovinos

Summary

Factors secreted by the oocyte (FSO) and the cumulus cells regulate the differentiation of the cumulus-oocyte complex. The KL is expressed by cumulus cells and stimulates oocyte nuclear maturation in rodents, but its functions in cumulus-oocyte complex (COC) cattle are not known. In this study, using as a model in vitro maturation (IVM) of bovine CCO, the following hypotheses were tested: 1 - both isoforms KL (KL1 and KL2) are expressed in cumulus cells and the levels of mRNA are regulated over cultivation; 2 - KL stimulates nuclear maturation and cumulus expansion; 3 - factors secreted by the oocyte (BMP15, FGF8, FGF10, FGF16 and FGF17) regulate the expression of KL mRNA in cumulus cells; 4 - the KL regulates the expression of mRNA BMP15, GDF9, FGF16, e c-KIT in the oocyte. Isoforms of KL (KL1 and KL2) showed similar expression patterns in cumulus cells along the MIV, with higher expression at 12 hours of cultivation. The addition of KL cultivation increased the percentage of oocytes in meiosis II and decreased oocyte meiosis I in the end of IVM, but did not affect cumulus expansion. The increased expression of FGF8 mRNA KL1 and KL2, while only

BMP15 stimulated mRNA expression KL1. Distinctly, the decreased expression of KL2 by FGF10. The FGF17 and FGF16 did not alter the expression of KL in cumulus cells. KL did not alter the expression of FSOs investigated. Taken together, our results suggest the involvement of KL in controlling bovine oocyte nuclear maturation and expression of KL in bovine cumulus cells is regulated by members of the families of FGFs and TGFβs.

Key Words: KL; FGF; BMP15; meiosis, in vitro maturation; cattle

Introdução

O desenvolvimento da competência oocitária ocorre de forma gradual e sequencial durante a foliculogênese e é dependente da interação entre o oócito e as células somáticas adjacentes. As células do cumulus transferem metabólitos e peptídeos reguladores para o oócito, que, por sua vez, controla a atividade das células do cumulus via secreção de fatores parácrinos (GICHRIST et al., 2006; GILCHRIST et al., 2008; GILCHRIST; RITTER, 2011), dentre os quais destacam-se membros da família dos fatores de crescimento transformante β (TGF β), em particular a BMP15 e o GDF9, e da família dos fatores de crescimento dos fibroblastos (FGF8, FGF10, FGF16 e FGF17; BURATINI et al., 2005; BURATINI et al., 2007; MACHADO et al., 2009; MACHADO, 2012). Por outro lado, embora menos explorados na literatura, fatores secretados pelas células do cumulus regulam a diferenciação do oócito, sendo o KL um dos principais representantes desse grupo (GILCHRIST et al., 2008; THOMAS; VANDERHYDEN, 2006).

Os FGFs e a BMP15 regula vários aspectos da maturação do complexo cumulus-oócito (CCO), como expansão das células do cumulus e metabolismo levando a melhores taxas de desenvolvimento embrionário em bovinos (CAIXETA, 2012; GILCHRIST; RITTER, 2011). A BMP15 e o FGF10 estimulam a expansão das células do cumulus (CAIXETA, 2012) e o FGF10 estimulou a progressão da meiose e o desenvolvimento embrionário (ZHANG, K. et al., 2010). O FGF8 juntamente com a BMP15 regulam o metabolismo glicolítico nas células do cumulus (SUGIURA et al., 2007). Zhang, M. et al. (2010) demonstraram que o FGF8 em combinação com BMP15 ou GDF9 eleva a expressão de NPR2 em células do cumulus de CCOs murinos oocectomizados, sugerindo o envolvimento do FGF8 na maturação nuclear.

A interação entre os fatores secretados pelo oócito (FSO) e o KL não é totalmente conhecida, sendo que na espécie bovina inexistem estudos a esse respeito. O KL é expresso em células da granulosa durante toda a

foliculogênese e ativa o receptor c-Kit, presente no oócito e células da teca (THOMAS; VANDERHYDEN, 2006; HUTT et al., 2006; CELESTINO et al., 2009). Em roedores, demonstrou-se que o KL inibe a expressão da BMP-15 em folículos pré-antrais e antrais iniciais (THOMAS; VANDERHYDEN, 2006; HUTT et al., 2006), já a BMP15 estimula a expressão de KL em folículos pré-antrais de camundongos (YAN et al. 2001; THOMAS et al., 2005).embora não se saiba se o mesmo ocorre durante a maturação do CCO.

O KL, gera por "splicing" alternativo dois transcritos que são traduzidos em duas proteínas ligadas à membrana denominadas KL1 e KL2 (HUANG et al., 1992). O KL1 que é a isoforma completa, e o KL2, que apresenta uma deleção no exon 6, conforme relatado em camundongos (HUANG et al., 1992). Por homologia, o exon 6 do camundongo corresponde ao exon 3 na sequência bovina. O KL1 pode ser rapidamente clivado por uma série de proteases originando um fator de crescimento solúvel (HUANG et al., 1992; ZHOU et al., 1994; KAWAGUCHI et al., 2007).

Ambos os fatores, KL1 e KL2, são biologicamente ativos *in vivo.* A supressão da expressão do KL1 leva a deficiências em melanócitos, anemia severa e infertilidade (BRANNAN et al, 1991). Em camundongos que expressam exclusivamente o KL2, deficiências leves na hematopoiese e desenvolvimento de mastócitos são observadas (TAJIMA et al., 1998). O KL2 é mais efetivo em promover o crescimento oocitário do que o KL1 (THOMAS et al., 2008), sugere-se que o KL2 possa ser a principal isoforma para desenvolvimento oocitário (TAJIMA et al., 1998; KIDDER; VANDERHYDEN, 2010) pois induz uma ativação mais persistente do receptor c-KIT (FLANAGAN; LEDER 1990; MIYAZAWA et al. 1995)

Poucos estudos exploraram a ação do KL em oócitos. O KL estimulou o crescimento e a sobrevivência do oócito com incremento da expressão de proteínas anti-apoptóticas em ratos (PACKER et al., 1994; ISMAIL et al., 1997; JIN et al., 2004; THOMAS et al., 2008), bem como a extrusão do primeiro corpúsculo polar durante a MIV em roedores além de estimular a síntese RNAm de ciclina B1 subunidade indutora da meiose (YE et al., 2009). Em contraste o KL atrasou a quebra da vesícula germinativa em ratos (ISMAIL 1997; ISMAIL et al., 1996) e o KL2 tenha ação de impedir a quebra da vesícula germinativa (THOMAS et al., 2008). A interação do KL com o sistema FGF já foi apontada na literatura. O FGF7 estimulou a expressão do KL em CCOs bovinos co-cultivados com células da granulosa (CHO et al., 2008). Por outro lado, o KL aumentou a expressão do FGF8 e GDF9 e reduziu a expressão de BMP15 no oócito de ratas (MIYOSHI et al., 2012).

Este trabalho objetivou investigar durante a maturação *in vitro* (MIV) de CCOs bovinos, os padrões de expressão dos RNAm do KL1 e KL2, os efeitos do KL sobre a progressão da meiose e expansão das células do

cumulus, bem como as interações entre o KL, BMP15 e FGFs oocitários na regulação da expressão de seus mRNA.

Material e Métodos

Maturação in vitro

Ovários de fêmeas adultas predominantemente Bos indicus foram obtidos em matadouro local e transportados para o laboratório em solução salina (0,9% NaCl) a 35-37 °C. Os COCs e o líquido folicular foram aspirados de folículos com 3-8 mm de diâmetro com uma agulha de calibre 18 e reunidos num tubo cônico de 15 ml. Após sedimentação, os COCs foram recuperados e selecionados usando um estereomicroscópio. Apenas COCs com citoplasma homogêneo, compactos e com múltiplas camadas de células do cumulus foram utilizados (Grau 1 e 2). Os CCOs foram lavados e transferidos em grupos de 20 para gotas de 100 ul de meio de maturação, exceto nos cultivos com kit ligante onde as gotas foram de 200 ul de meio de maturação [TCM199 contendo Sais de Earle suplementado com 22 ug/ml de piruvato de sódio, 75 ug/ml de amicacina, 1 ug/ml FSH (pFSH, Folltropin-V® Bioniche, ON, CA), 10 UI/ml LH (pLH, Lutropin-V®, Bioniche, ON, CA)]. As gotas foram cobertas com óleo mineral e incubados a 38,5 ° C em 5% de CO_2 e ar humidificado.

O padrão de expressão dos RNAm do KL1 e KL2 foi avaliado ao longo da MIV em cultivos interrompidos às 4, 8, 12, 16 e 22 horas (n=4/momento). Complexos cumulus-oócito imaturos foram utilizados para representar 0 horas de cultivo. Para avaliar os efeitos do KL sobre a expansão do cumulus, progressão da meiose e expressão de fatores oocitários, CCOs foram cultivados por 22 horas e o meio de cultivo foi acrescido de doses crescentes de KL [0, 10, 50 e 100ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); n=9/dose para avaliação dos efeitos sobre a progressão da meiose e n=4/dose para avaliação dos efeitos sobre a expansão e expressão gênica. Para investigar os efeitos dos fatores oocitários sobre a expressão do KL1 e KL2 nas células do cumulus, o meio de cultivo foi acrescido de doses crescentes de BMP15 [0, 10, 50 e 100ng/ml (R&D Systems)], FGF10 [0, 0,5, 10 e 50ng/ml (R&D Systems)], FGF16 [0, 1, 10 e 100ng/ml (R&D Systems)], FGF8 [0, 1, 10 e 100ng/ml (Peprotech Princenton, NJ, USA)] ou FGF17 [0, 1, 10 e 100ng/ml (R&D Systems)].

Avaliação da expansão das células do cumulus e progressão da meiose nos oócitos

Complexos cumulus-oócitos intactos após o cultivo de 22 horas foram submetidos a avaliação visual em estereomicroscópio da expansão das células do cumulus e classificados em grau 1, 2 ou 3, onde grau 1 indicou expansão ausente ou muito fraca, grau 2 expansão moderada e grau 3 expansão completa.

Para avaliação do progresso da meiose, os oócitos foram desnudos, submetidos a coloração com o reagente HOESCHT 33342 (Sigma, St. Louis, MO, USA) e observados em microscópio de epifluorescência sob excitação de luz UV.

Análise da expressão gênica

As células do cumulus e oócitos (n= 20CCO/grupo) foram mecanicamente separados por sucessivas pipetagens em gotas de PBS. Oócitos desnudos foram lavados três vezes em PBS. As células do cumulus foram transferidas para um tubo de 1,5 ml, centrifugadas durante 5 minutos a 700 g, após o que o sobrenadante foi descartado e 350 ul de tampão de lise foram adicionados ao precipitado de células celulares, o que foi armazenado a -80°C para posterior extração de RNA. A extração do RNA total dos pools de 20 oócitos e celulas do cumulus de grupos de 20 CCOs foi realizada utilizando-se o kit RNeasy (Qiagen, Mississauga, ON, CA) conforme as instruções do protocolo do fabricante. Após a purificação, as amostras de RNA total foram suspensas em 30 µl de água ultrapura livre de RNAse. A concentração do RNA total extraído das amostras foi mensurado no epectofotômetro NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Alíquotas de 100ng de RNA total foram tratadas com DNAse I (1 U/µg; Invitrogen, São Paulo, Brazil) e só então submetidas à transcrição reversa com primers Oligo-dT e enzimas Omniscript ou Sensiscript (Qiagen, Mississauga, ON, CA) para células do cumulus e oócitos, respectivamente.

A avaliação da expressão gênica foi realizada por RT-PCR em tempo real com termociclador ABI 7500 utilizando o sistema de detecção Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) com volume final de 25µl para todos os genes alvos e endógenos. Os ciclos de PCR foram repetidos 40 vezes conforme a seguir: 95°C por 10 minutos, desnaturação a 95°C por 10 segundos seguido de anelamento por 1 minuto. As temperatura de anelamento foram distintas para cada primer e aparecem especificadas na Tabela 1, bem como a sequência e tamanho dos *amplicons* (fragmentos amplificados). As reações foram otimizadas para obter máxima eficiência para cada gene. Para KL foram designadas estratégias na montagem dos primers. Desenhou-se o par de primers KL1-2 com o primer *forward* no exon 2 e o primer *reverse* no exon 4 da sequência bovina do KL, a fim de localizar as duas isoformas. Posteriormente, utilizando-se primers específicos para KL2, (*forward* na

junção entre o exon 2 e o exon 4 e *reverse* no exon 4) e KL1 (*forward* no exon 2 e *reverse* no exon 3), avaliando as duas isoformas separadamente.

Cada amostra foi corrida em duplicata e a especificidade do produto de PCR foi testada pela curva de dissociação e avaliação do tamanho do *amplicon* em eletroforese em gel de agarose 2,5%. Para seleção do controle endógeno mais estável, os perfis de amplificação dos genes Ciclofilina-A (CYC-A), Gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase (GAPDH) e Histona (H2A) foram testados utilizando o programa geNorm para Microsoft Exel (medgen.ugent.be/genorm; VANDESOMPELE et al., 2002). Tanto para oócitos quanto para células do cumulus, o gene endógeno mais estável foi a CYC-A. Os valores de expressão relativa para cada gene foram calculados pelo método ΔΔCt com correção da eficiência e uma amostra como calibradora (PFAFFL, 2001). A média da eficiência para cada gene foi calculada a partir do perfil de amplificação de cada amostra com o software LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003).

Análise estatística

Os dados de progressão da meiose e expansão das células do cumulus foram transformados em arcoseno. Os dados de expressão gênica foram transformados em log quando não apresentaram distribuição normal e quando mesmo após transformação a distribuição não foi normal, o teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado na avaliação da expressão de GDF9, BMP15 e c-KIT no oócito tratado com KL. De forma geral,.os efeitos do tempo e dos tratamentos foram testados por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas com teste de Tukey-Kramer HSD quando diferentes. A análise estatística foi feita utilizando-se o software JMP (SAS Institute, Cary, NC, USA) e os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). Diferenças foram consideradas significativas quando $P<0.05$.

Resultados

1- Expressão das isoformas KL1 e KL2 em células do cumulus e do receptor c-KIT no oócito bovino ao longo da maturação in vitro de CCOs bovinos

Para confirmar a presença das duas isoformas do KL (KL1 e KL2) nas células cumulus utilizamos primers específicos para verificar a presença das duas isoformas. Dessa forma, observou-se a presença de dois picos de dissociação (Fig. 1a) no RT-PCR em tempo real, indicando a produção de dois amplicons de tamanho diferentes. Na eletroforese em gel de agarose 3%, duas bandas foram visualizadas, uma banda de 122pb

correspondente a isoforma 2, desprovida do exon 3 de 84 nucleotídeos, e uma outra banda de 206pb correspondente ao KL1, a isoforma completa (Fig. 1b). As duas isoformas foram encontradas tanto nas células do cumulus imaturas quanto nas maturadas por 22 horas.

Posteriormente, utilizando-se primers específicos para KL2 e KL1, foi confirmada a expressão de ambas as isoformas por RT-PCR em tempo real apresentando pico de dissociação único para cada par de primers, seguido por eletroforese identificando banda única para cada par de primers (111pb e 92pb para KL1 e KL2, respectivamente).

Os padrões de expressão dos RNAm do KL1 e KL2 nas células do cumulus ao longo da maturação *in vitro* de CCOs mostraram-se semelhantes. Observou-se menor expressão dos RNAm do KL1 e KL2 nas células do cumulus imaturas e aumento da abundância dos RNAm durante a MIV com níveis máximos atingidos às 12 horas do cultivo (Fig. 2). Já a expressão do receptor c-kit no oócito não variou ao longo da maturação (Fig. 2).

2- Efeitos do KL sobre a maturação e expansão das células do cumulus.

A adição de KL ao meio de cultivo não afetou a expansão das células do cumulus (Fig. 3), mas estimulou a progressão da meiose conforme indicado pelo aumento da proporção de oócitos em meiose II e diminuição da proporção de oócitos em meiose I observado em CCOs cultivados com 50ng/mL de KL. (Fig. 4).

3- Efeitos do KL e dos FSOs sobre a expressão gênica

O KL não interferiu na expressão dos RNAm dos FSOs investigados (FGF16, BMP15 e GDF9), nem na expressão do c-kit (Fig. 5)

O FGF16 e o FGF17 não alteraram a expressão dos RNAm do KL1 e KL2. Distintamente, o FGF8, o FGF10 e a BMP15 alteram de forma particular a expressão dos RNAm do KL. O FGF8 aumentou a expressão dos RNAm do KL1 e do KL2 nas doses de 10 e 100ng/ml, enquanto que a BMP15 aumentou apenas a expressão do RNAm do KL1, mas não do KL2, na dose de 100ng/mL. Em contraste, o FGF10 reduziu a expressão do RNAm do KL2 na dose de 100ng/mL sem interferir na expressão do KL1 (Fig. 6).

Discussão

O diálogo das células do cumulus com o oócito via secreção de fatores parácrinos é indispensável para a aquisição da competência oocitária. Este estudo demonstra pela primeira vez que o KL secretado pelas células do cumulus estimula a progressão da meiose e é regulado pela BMP15 e FGFs oocitários em bovinos.

Os resultados da análise da expressão dos RNAm do KL1 e KL2 ao longo da maturação *in vitro* de CCOs indicam de forma inédita que essas isoformas têm padrão de expressão semelhante ao longo da maturação, com níveis baixos antes do início da maturação e nível máximo de expressão às 12 horas do cultivo. O aumento da expressão das isoformas do KL durante a MIV sugere o envolvimento do KL no controle da diferenciação do CCO. Este é o primeiro estudo a investigar a expressão das isoformas KL1 e KL2 nas células do cumulus de bovinos ao longo da maturação.

Como o sistema de MIV simula a fase pré-ovulatória, pode ser que o padrão de expressão do KL1 e KL2 esteja sendo mantido como o padrão *in vivo*, mostrado em camundongos por Joyce et al., (1999), onde o KL1 e KL2 estão com baixa expressão nas células da granulosa mural e células do cumulus na fase antral mas na fase pré-ovulatória sofre um incremento da expressão de KL1 e KL2 em ambos tipos celulares.

O FSH pode estumular a expressão de KL (DRIANCOURT et al., 2000), sugere-se que o incremento de expressão de KL encontrado se deve ao FSH que pode estar atuando via EGF, embora em camundongos o EGF não tenha efeito positivo na expressão de KL (JOYCE et al., 1999)

É sabido que a BMP15 e o GDF9 regulam a expressão do KL em roedores. A BMP15 estimula a expressão de KL e o GDF9 inibe a expressão de KL em camundongos (THOMAS; VANDERHYDEN, 2006). Supõe-se que, em camundongos, oócitos de folículos pré antrais secretem primariamente BMP-15, o que estimula a expressão de KL, enquanto que oócitos de folículos antrais expressam primariamente GDF-9, reduzindo a expressão do KL. Contudo, distintamente de oócitos murinos, oócitos bovinos expressam mais BMP15 do que GDF9 na fase antral (CRAWFORD; MCNATTY, 2012), o que pode determinar diferenças na regulação da expressão do KL nas células do cumulus entre as espécies. Durante o cultivo de CCO oocectomizados apresentam expressão de KL1 e KL2 nas células do cumulus maior do que CCO intactos e CCO oocectomizados cultivados com oócitos, sugerindo que o oócito inibe a expressão de KL (JOYCE et al., 1999). Um contraste interessante com nossos resultados onde fatores seretados pelo oócito estimularam a expressão de KL. Esse contraste eventualmente se deve a diferenças entre espécies mas também no sistema de cultivo, pois em nosso experimento utilizamos apenas CCOs intactos tratados com FSO não retirando a influência do oócito.

Os FSO alteraram a expressão do KL nas células do cumulus. Dentre os FSO testados, apenas o FGF16 e o FGF17 não interferiram na expressão do KL1 e do KL2. A BMP15 elevou a expressão de KL1 e não interferiu na expressão de KL2. O efeito estimulatório da BMP15 sobre a expressão do KL1 é compatível com estudos em folículos pré-antrais de roedores, sugerindo que essa ação da BMP15 é independe da fase de desenvolvimento.

O FGF10 inibiu a expressão do KL2 nas células do cumulus no presente estudo, em contraste com os efeitos positivos do FGF7, membro da mesma família de FGFs e capaz de ativar os mesmos subtipos de receptores, sobre a expressão do KL em células da granulosa de folículos pré-antrais de roedores (PARROT; SKINNER, 1998; PARROT; SKINNER, 2000; KEZELE et al., 2005) e em CCOs bovinos co-cultivados com células da granulosa (CHO et al., 2008). O FGF7, tanto em ratos como em bovinos, é expresso na camada da teca e estimula a expressão de KL. Distintamente do FGF10, o FGF7 não é expresso pelo oócito bovino (BURATINI et al., 2007). Portanto, é lógico supor que o FGF10 seja mais importante na regulação parácrina das células do cumulus. O efeito inibitório do FGF10 sobre a expressão do KL2, sugerido como subtipo do KL mais potente em estimular a competência oocitária (TAJIMA et al., 1998; KIDDER; VANDERHYDEN, 2010), parece não comprometer a competência para o desenvolvimento do CCO, uma vez que Zhang et al., (2010) demonstram que o FGF10 estimula a progressão da maturação e favorece o desenvolvimento de embriões *in vitro.* O efeito inibitório do FGF10 sobre o KL2 foi observado às 22 horas da MIV. É possível que esse efeito restrinja-se ao final da maturação e não interfira em momentos anteriores mais determinantes da diferenciação do CCO. A avaliação dos efeitos do FGF10 e de sua interação com outros FSOs na regulação da expressão do KL1 e KL2 ao longo da MIV é necessária para uma melhor compreensão do impacto da sinalização do FGF10 sobre o sistema KL.

Distintamente, o FGF8 estimulou a expressão do KL1 e do KL2 no presente estudo. Os diferentes efeitos do FGF8 em relação ao FGF10 podem ser decorrentes da sinalização por receptores distintos. Enquanto o FGF10 ativa preferencialmente o FGFR1B e o FGFR2B, o FGF8 ativa o FGF3C, o FGFR4 e o FGFR2C (ZHANG, et al., 2006). Por outro lado, a discrepância entre os efeitos do FGF8 e do FGF17, que não alterou a expressão do KL1 e KL2, é intrigante. Esses FGFs pertencem a mesma família, ativam os mesmos receptores mas têm padrões de expressão diferentes no CCO, o FGF8 está presente no oócito imaturo e no maturado enquanto o FGF17 está presente apenas no oócito imaturo (ZHANG ET AL., 2006; CAIXETA, 2012).

Na literatura as informações sobre interações FGF-FGFR são incompletas e contraditórias. A presença de 18 ligantes e sete FGFRs cria 126 potenciais interações do complexo FGF-FGFR, onde apenas uma pequena fração tem sido estudada (MOHAMMADI et al., 2005b). A ativação de um receptor FGFR pode ocorrer por vários FGFs, por exemplo o FGFR2b pode ser ativado tanto pelo FGF1 quanto pela família FGF7, mas para que ocorra a dimerização do receptor e ativação da via sinalização existe uma diferença, o FGF7 precisa de oligossacarídeos mais longos do que FGF1 para que a sinalização ocorra (MOHAMMADI et al., 2005a), além disso membros de uma mesma família que se ligam ao mesmo receptor como FGF7 e FGF10 podem resultar em

respostas celulares diferentes por terem ativarem a dimerização do receptor de forma diferenciada e que a alteração estrutural do FGF10 para a mesma estrutura do FGF7 pode gerar a mesma resposta que o FGF7 (MAKARENKOVA et al., 2009).

A observação do aumento da expressão do KL durante a MIV motivou a investigação dos seus efeitos sobre a expansão do cumulus e progressão da meiose. Nenhum efeito foi observado sobre a expansão do cumulus, mas o tratamento com KL estimulou a progressão da meiose. Os efeitos do tratamento com KL sobre a maturação do complexo cumulus-oócito já foram testados em camundongos por Ye et al., (2009), que não encontraram alteração na expansão das células do cumulus, mas observaram efeito positivo sobre a progressão da meiose, em sintonia com os dados presentes.

O KL regula proliferação, sobrevivência, migração, crescimento e diferenciação celular por meio de várias vias de sinalização, sendo a PI3K/AKT (fosfatidil inositol 3 quinase/proteina quinase B) uma das principais (MERKWITZ et al., 2011). O efeito do KL sobre a maturação nuclear observado no presente estudo é compatível com ações conhecidas da via PI3K/AKT. A AKT está envolvida diretamente na progressão do ciclo celular e estimula a transição tanto da fase G1 para a fase S, quanto da fase G2 para a fase M. Na transição G1/S ocorre ativação de vários fatores, dentre eles a ciclina D e a ciclina E. Na transição G2/M ocorre ativação da ciclina B e do fator CDC25, ambos envolvidos na ativação do fator promotor da maturação (MPF; LIU et al., 2006; LIM et al., 2010; MERKWITZ et al., 2011; XU et al., 2012). O MPF induz o RVG (rompimento da vesícula germinativa), retomada da meiose, a condensação parcial dos cromossomos, além de ativar as vias da MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos) e RhoA. A MAPK permite a condensação cromossômica e a organização dos microtúbulos para formação do fuso meiótico, além de recrutar filamentos de actina e miosina. A RhoA faz o recrutamento apenas de miosina. Ambos os fatores são ativados pelo MPF e ativam a contração do anel de actina/miosina formado próximo ao fuso meiótico, ocorrendo então a extrusão do corpúsculo polar. (KOTANI; YAMASHITA, 2002; WU et al., 2010). Se ocorrer uma falha na ativação da MAPK ou do RhoA, o alinhamento e a separação cromossômica são prejudicados (KOTANI; YAMASHITA, 2002).

Além disso, o fato da expressão de KL1 e KL2 estar elevada nas células do cumulus às 12 horas de cultivo, coincidente com a formação do primeiro fuso meiótico e o pico de atividade MPF em bovinos (GONÇALVES et al., 2008), reforça a hipótese de que o KL estimulou a progressão da meiose via ativação da sinalização PI3K/AKT e do fator MPF no presente estudo, embora esses parâmetros não tenham sido medidos. É possível que essa via de sinalização ainda colabore para a formação do segundo fuso meiótico, pois a expressão do KL manteve-se elevada até o final da maturação nas células do cumulus no presente estudo.

O KL não interferiu na expressão dos principais fatores secretados pelo oócito bovino. Em oócitos de folículos pré-antrais de roedores, o KL inibiu a expressão de BMP15 (THOMAS; VANDERHYDEN, 2006; HUTT et al., 2006) e, em oócitos de folículos antrais de ratos cocultivados com células da granulosa, ele aumentou a expressão do FGF8 (MIYOSHI et al., 2012). Em contraste, em nosso estudo o KL não interferiu na expressão dos FSO bovino durante a MIV. Esse resultado é compatível com o conceito de que os RNAm oocitários estão relativamente estáveis e que há pouca atividade transcricional na fase de maturação. Embora a atividade transcricional dos oócitos diminua drasticamente após atingirem seu tamanho máximo, estudos recentes sugerem que alguns genes possam ser transcritos durante a maturação como STC1 que regula metabolismo e homeostase mineral, PLAU regula a expansão das células do cumulus, ANXA1 que regula apoptose e sinalização celular (MAMO et al., 2011)

Conclusão

O presente estudo demonstra pela primeira vez a presença das duas isoformas do KL nas células do cumulus e seu padrão de expressão ao longo da maturação. O aumento da expressão do KL durante a maturação do CCO sugere seu envolvimento nos mecanismos reguladores desse processo. Além disso, os dados presentes indicam que o KL estimula a progressão da meiose e que diferentes FSOs regulam de forma particular a expressão das isoformas do KL nas células do cumulus. Esses resultados contribuem para um melhor entendimento da interação entre o oócito e as células do cumulus, importante para o aprimoramento dos protocolos para maturação *in vitro* do CCO.

Referências Bibliográficas

BURATINI, J., PINTO, M. G., CASTILHO, A. C., AMORIM, R. L., GIOMETTI, I. C., PORTELA, V. M., NICOLA, E. S.; PRICE, C. A. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. **Biol Reprod**, v. 77, p. 743-750, 2007.

BURATINI, J., TEIXEIRA, A. B., COSTA, I. B., GLAPINSKI, V. F., PINTO, M. G., GIOMETTI, I. C., BARROS, C. M., CAO, M., NICOLA, E. S.; PRICE, C. A.. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. **Reproduction**, v. 130, p. 343-350. 2005

CELESTINO, J.J.H.; MATOS, M.H.T.; SARAIVA, M.V.A.; FIGUEIREDO, J.R. 2009. Regulation of ovarian folliculogenesis by kit ligand and the c-KIT system in mammals. **Anim Reprod**, v.6, p.431-439.

CHO, J-H.; ITOH, T.; SENDAI, Y.; HOSHI, H. Fibroblast growth factor 7 stimulates in vitro growth of oocytes originating from bovine early antral follicles. **Mol Reprod Dev**, v.75, p.1736-1743, 2008.

CRAWFORD, J.L.; MCNATTY, K. P. The ratio of growth differentiation factor 9: Bone morphogenetic protein 15 mRNA expression is tightly co-regulated and differs between species over a wide range of ovulation rates. **Mol Cell Endocrinol**, v. 348, p. 339-343. 2012.

DRIANCOURT, M-A.; REYNAUD, K.; CORTVRINDT, R.; SMITZ J. 2000. Roles of kit and kit ligand in ovarian function. **Rev Reprod**, v.5, p.143-152.

EPPIG, J.J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**; v.122, p.829-838.

FEUERSTEIN P, PUARD V, CHEVALIER C, TEUSAN R, CADORET V, GUERIF F, HOULGATTE R, ROYERE D. Genomic assessment of human cumulus cell marker genes as predictors of oocyte developmental competence: impact of various experimental factors. **PLoS One**, v. 7(7), p.e40449, 2012.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Anim Reprod Sci**, v. 78, 135-163, 2003.

GILCHRIST, R. B., LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Hum Reprod Update**, v. 14, 159-177, 2008.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J. Differences in the participation of TGFB superfamily signalling pathways mediating porcine and murine cumulus cell expansion. **Reproduction**, v. 142, p. 6476-57, 2011.

GILCHRIST, RB; RITTER, LJ; MYLLYMAA, S; KAIVO-OJA, N; DRAGOVIC, RA; HICKEY, TE; RITVOS, O; MOTTERSHEAD, DG. Molecular basis of oocyte-paracrine signaling that promotes granulose cell proliferation. **J Cel Sci**, v. 119, p. 3811-3821, 2006.

HUTT, K. J., MCLAUGHLIN, E. A.; HOLLAND, M. K. Kit ligand and c-KIT have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. **Mol Hum Reprod**, v. 12, p. 61-69, 2006.

JOYCE, I. M., PENDOLA, F. L., WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J. J. Oocyte regulation of kit ligand expression in mouse ovarian follicles. **Dev Biol**, v. 214, p. 342-53, 1999.

KEZELE, P.; NILSSON, E.E.; SKINNER, M.K. Keratinocyte growth factor acts as mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. **Biol Reprod**, v.73, p.967-973, 2005.

KIDDER, G. M.; VANDERHYDEN, B. C. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 88, 399-413, 2010

KOTANI, T.; YAMASHITA, M. Discrimination of the roles of MPF and MAP kinase in morphological changes that occur during oocyte maturation. **Dev Biol**, v. 252, p. 271-286, 2002.

LI, R.; NORMAN, R.J.; ARMSTRONG, D.T.; GILCHRIST, R.B. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulose cells and cumulus cells. **Biol Reprod**, v.63, p.839-845, 2000.

LIM, J. J., EUM, J. H., LEE, J. E., KIM, E. S., CHUNG, H. M., YOON, T. K., KIM, K. S.; LEE, D. R. Stem cell factor/c-KIT signaling in in vitro cultures supports early mouse embryonic development by accelerating proliferation via a mechanism involving Akt-downstream genes. **J Assist Reprod Genet**, v. 27, 619-627, 2010.

LIU, K., RAJAREDDY, S., LIU, L., JAGARLAMUDI, K., BOMAN, K., SELSTAM, G.; REDDY, P. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. **Dev Biol**, v. 299, p. 1-11, 2006

MACHADO, F. M. 2012. **Expressão e função de membros das subfamílias fgf-8 e fgf-9 em folículos antrais bovinos**. 2012. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

MACHADO, M. F., PORTELA, V. M., PRICE, C. A., COSTA, I. B., RIPAMONTE, P., AMORIM, R. L. & BURATINI, J. Regulation and action of fibroblast growth factor 17 in bovine follicles. **J Endocrinol**, v. 202, 347-53, 2009.

MAKARENKOVA, H. P.; HOFFMAN, M. P.; BEENKEN, A.; ELISEENKOVA, A. V.; MEECH, R.; TSAU, C.; PATEL, V. N.; LANG, R. A.; MOHAMMADI, M. Differential Interactions of FGFs with Heparan Sulfate Control Gradient Formation and Branching Morphogenesis. Sci Sgnal, v.2 (88), p. ra55. 2009.

MAMO, S., CARTER, F., LONERGAN, P., LEAL, C. L., AL NAIB, A., MCGETTIGAN, P., MEHTA, J. P., EVANS, A. C.; FAIR, T. Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and in vitro matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. **BMC Genomics**, v. 12, p. 151. 2011.

MCNATTY, K.P.; MOORE, L.G.; HUDSON, N.L.; QUIRKE, L.D.; LAWRENCE, S.B.; READER, K.; HANRAHAN, J.P.; SMITH, P.; GROOME, N.P.; LAITINEN, M.; RITVOS, O.; JUENGEL, J.L. 2004. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. **Reproduction**, v.128, p.379-386

MÉNÉZO, Y. J.; HÉRUBEL, F. Mouse and bovine models for human IVF. **Reprod Biomed Online**, v. 4, p. 170-175, 2002.

MERKWITZ, C., LOCHHEAD, P., TSIKOLIA, N., KOCH, D., SYGNECKA, K., SAKURAI, M., SPANEL-BOROWSKI, K.; RICKEN, A. M. Expression of KIT in the ovary, and the role of somatic precursor cells. **Prog Histochem Cytochem,** v. 46, p. 131-184, 2011.

MIYOSHI, T.; OTSUKA, F.; NAKAMURA, E.; INAGAKI, K.; OGURA-OCHI, K.; TSUKAMOTO, N.; TAKEDA, M.; MAKINO, H. 2012. Regulatory role os kit ligand-c-KIT interaction and oocyte factors in steroidogenesis by rat granulose cells. **Mol Cell Endocrinol** Accepted Manuscript. DOI: 10.1016/j.mce.2012.02.011.

MOHAMMADI, M.; OLSEN, S. K.; GOETZ, R. A protein canyon in the FGF–FGF receptor dimer selects from an a` la carte menu of heparan sulfate motifs. **Current Opin Struc Biol,** v. 15, p. 506-516. 2005a.

MOHAMMADI, M.; OLSEN, S.K.; IBRAHIMI, O. A. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. **Citokine Growth Factor Reviews**, v. 16, p. 107-137. 2005b.

PARROTT, J.A.; SKINNER, M.K. 2000. Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. **Mol Reprod Dev**, v.55, p.55-64.

PARROTT, J.A.; SKINNER, M.K. Thecal cell-granulosa cell interactions involve a positive feedback loop among keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor, and kit ligand during ovarian follicular development. **Endocrinology**, v.139, p.2240-2245. 1998.

PFAFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR.Nucleic Acids Res 29, 2002-2007, 2001.

RAMAKERS C, RUIJTER JM, DEPREZ RH, MOORMAN AF Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neurosci Lett 339, 62-66, 2003

REGASSA, A., RINGS, F., HOELKER, M., CINAR, U., THOLEN, E., LOOFT, C., SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cells. **BMC Genomics**, v. 12, p. 57, 2011.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Bioch Biophys Acta** 2012 doi:10.1016/j.bbadis.2012.05.013.

SU YQ, SUGIURA K, EPPIG JJ. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. **Semin Reprod Med**, v. 27p. 32-42, 2009.

SU, Y.Q.; SUGIURA, K.; WIGGLESWORTH, K; O'BRIEN, M.J.; AFFOURTIT, J.P.; PANGAS, S.A.; MATZUK, M.M.; EPPIG, J.J. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. **Development.**, v. 135(1), p.111-121, 2008.

TAJIMA, Y., MOORE, M. A., SOARES, V., ONO, M., KISSEL, H.; BESMER, P. Consequences of exclusive expression in vivo of Kit-ligand lacking the major proteolytic cleavage site. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, 11903-11908, 1998.

THOMAS, F. H.; VANDERHYDEN, B. C. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 4, p. 19, 2006.

VANDESOMPELE J, PRETER KD, PATTYN F, POPPE B, ROY NV, PAEPE AD, SPELEMAN F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 3, 1-11, 2002.

XU, N., LAO, Y., ZHANG, Y.; GILLESPIE, D. A. Akt: a double-edged sword in cell proliferation and genome stability. **J Oncol**, p. 951724, 2012.

YE, Y., KAWAMURA, K., SASAKI, M., KAWAMURA, N., GROENEN, P., GELPKE, M. D., RAUCH, R., HSUEH, A. J. & TANAKA, T. Kit ligand promotes first polar body extrusion of mouse preovulatory oocytes. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 7, p. 26, 2009

ZHANG, K., HANSEN, P. J.; EALY, A. D. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. **Reproduction**, v. 140, p. 815-826, 2010.

Kit ligante estimula o progresso da meiose e sua expressão é estimulada pela proteína morfogenética óssea 15 (BMP15) e por fatores de crescimento dos fibroblastos (FGF) no complexo cumulus-oócito bovino.

TABELA

Tabela 1: Sequência dos primers, tamanho dos amplicons, temperatura de anelamento, concentração final do primer e eficiências de amplificação para cada gene avaliado

Genes	Sequência de Primers (5'- 3')	Amplicon	Temperatura anelamento	Concentração	Eficiência
BMP15	F-GTCAGCAGCCAAGAGGTAGTG	306bp	59°C	200nM	98.7%
	R- CCCGAGGACATACTCCCTTAC				
GDF9	F-TGGTCCTTGCTGAAGCATCTAGA	202bp	59°C	250nM	94.80%
	R- ACAGTGTTGTAGAGGTGGCTTCT				
C-KIT	F-ATCATGAAGACCTGCTGGGATGCT	128bp	60°C	300nM	91%
	R-GGGCTGCAGTTTGCTAAGTTGGAA				
KL1-2	F-TGCCTTCAAGGACTTGGAGATAGTGG	122pb e 206pb	61°C	200nM	96.42%
	R-CTGCCCATTGTAGGCTGGAATCTT				
KL1	F- GTGTGATTTCCTCAACATCAAGTCC	111pb	60°C	300nM	96.8%
	R- TGCTACTGCTGTCATTCCTAAGGG				
KL2	F- AAGGGAAGGCCTCAAATTCCATTGAAGA	92pb	60°C	300nM	93%
	R- AGCAAACCCGATCACAAGAGA				
H2A	F – GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG	104pb	60°C	350nM	94%
	R – TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC				
GAPDH	F – GGCGT	119pb	62°C	150nM	87%
	R – CCCTCCACGATGCCAAAGT				
CYC-A	F – GCCATGGAGCGCTTTGG	65pb	60°C	300nM	99.8%
	R – CCACAGTCAGCAATGGTGATCT				
FGF16	F – ACTGGTACAACACCTATGCCTCCA	84pb	61°C	300nM	98%
	R – AGCCGTCTTTATTCAGGGCCACAT				

Kit ligante estimula o progresso da meiose e sua expressão é estimulada pela proteína morfogenética óssea 15 (BMP15) e por fatores de crescimento dos fibroblastos (FGF) no complexo cumulus-oócito bovino.

ILUSTRAÇÕES

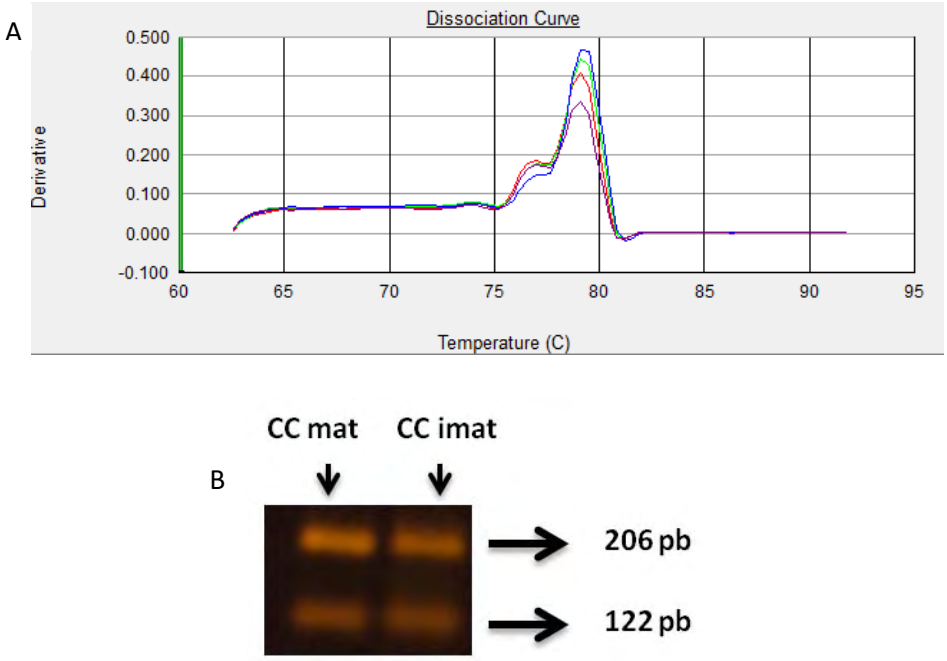

Figura 1: (A) Curva de dissociação do RT-PCR em tempo real. Mostrando dois picos indicativo da presença de dois tamanhos de amplicons, pois a dissociação ocorre em duas temperaturas. (B) Eletroforese em gel de agarose 3%. Mostrando presença da isoforma completa (206 pb) e a isoforma sem exon 3 (122pb), tanto nas células do cumulus maturadas (CC mat) quanto nas células do cumulus imaturas (CC imat).

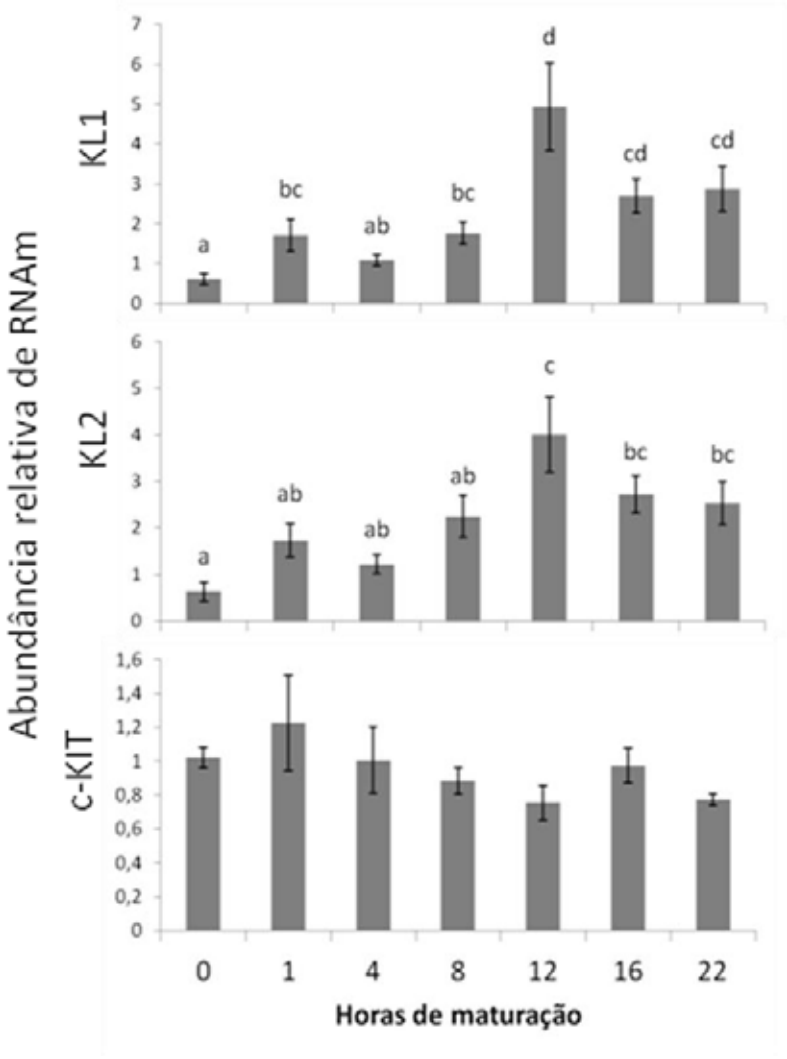

Figura 2: Abundância relativa de RNAm de KL1 e KL2 nas células do cumulus durante o cultivo *in vitro* de CCO por 0 (imaturo), 4, 8, 12, 16 e 22 de maturação (n= 4 réplicas; KL1 p=0.0001; KL2 p=0.0001), letras diferentes representam diferenças significativas. Abundância relativa de RNAm de c-KIT em oócitos durante o cultivo *in vitro* de CCO por 0 (imaturo), 4, 8, 12, 16 e 22 de maturação (n= 4 réplicas; p= 0.4237). Dado é apresentado como média dos valores relativos da amostra calibradora pelo método ΔΔCt com correção da eficiência. Barras com letras diferentes representam diferenças significativas (P<0.05).

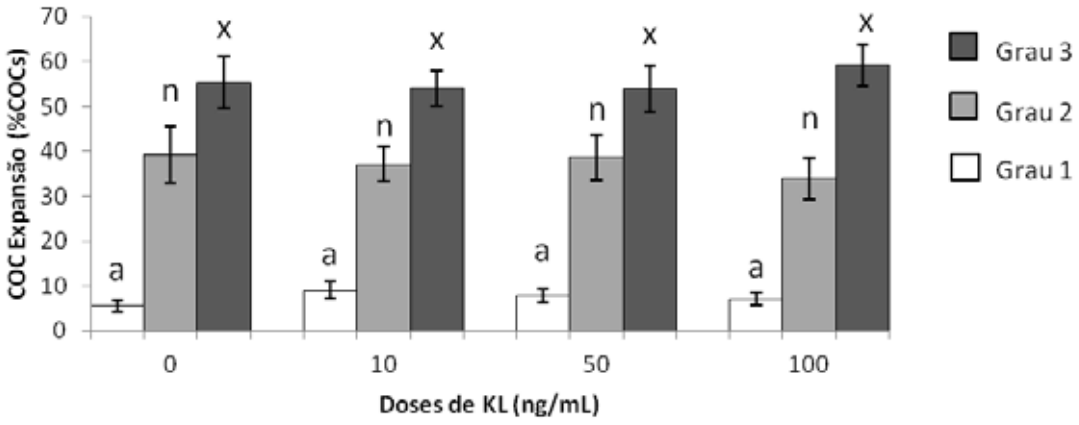

Figura 3: Grau de expansão das células do cumulus após o cultivo com KL com doses crescentes (0, 10, 50 e 100ng/ml) às 22 horas de cultivo (n=4). Onde Grau1: pouco expandido (p=0.7381); Grau2: expandido (p=0.5823); Grau3: completamente expandido (p= 0.3434).

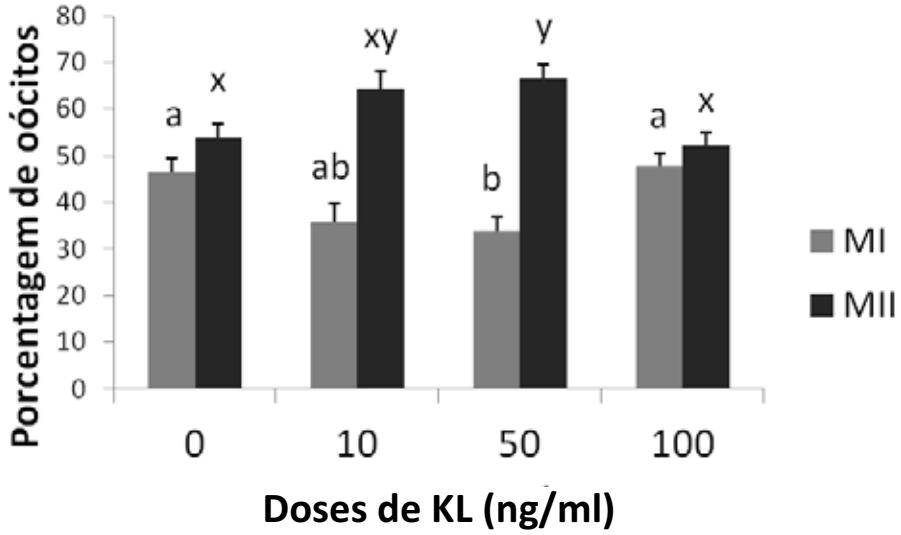

Figura 4: Efeito de crescentes doses de Kit ligante (0, 10, 50 e 100ng/ml) sobre a progressão da meiose em oócitos bovinos cultivados por 22 horas (n=9). O gráfico mostra a porcentagem de oócitos em metáfase 1 (MI; p=0.0069) e metáfase 2 (MII; p=0.0068) após 22 horas de maturação. A proporção de oócitos em MII foi maior na dose de 50ng/ml. Letras diferentes dentro de MI ou MII indicam diferenças significativas (P<0.05).

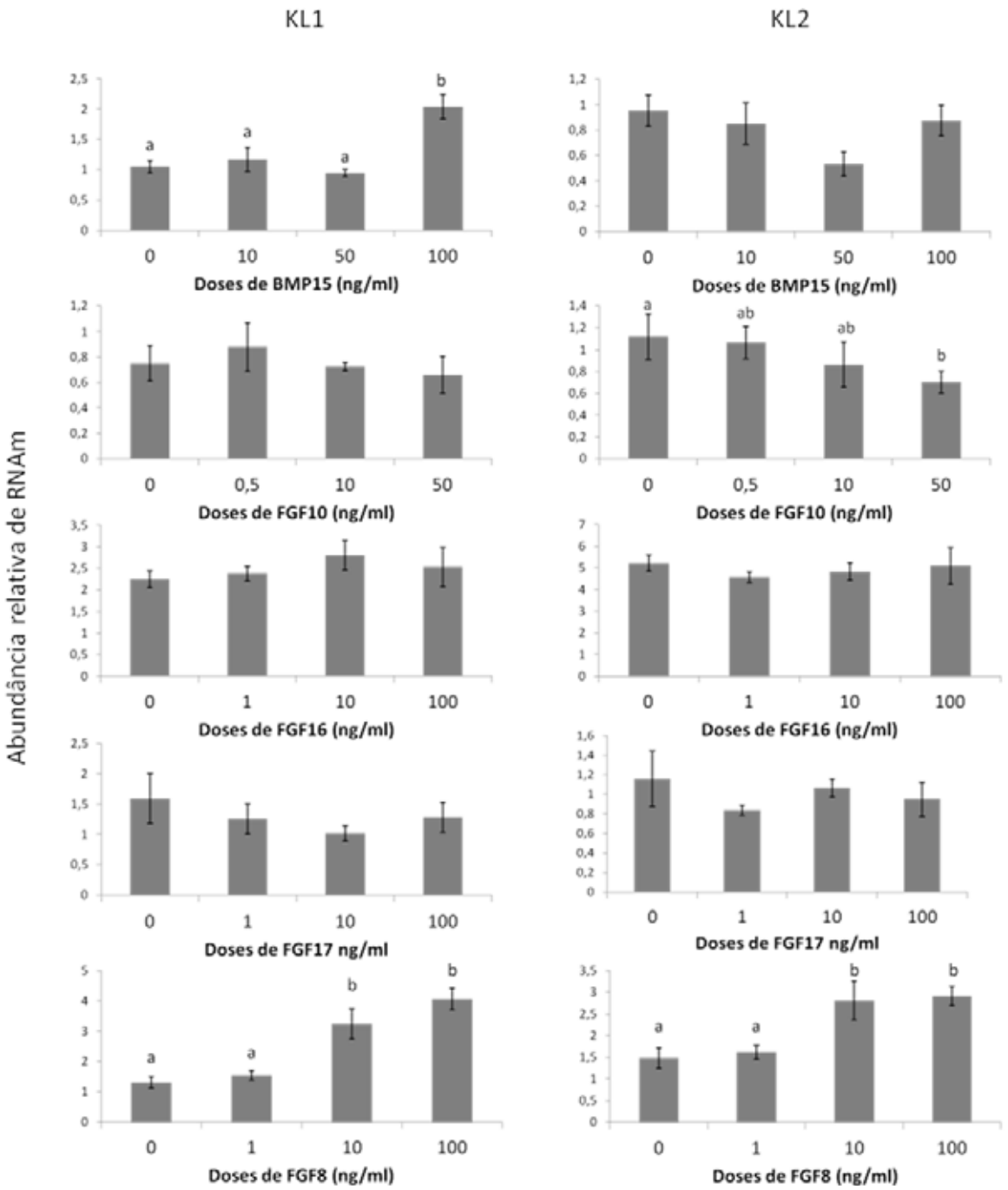

Figura 5: Efeito dos FSO (FGF8, FGF17, FGF16, FGF10 e BMP150) sobre a expressão de KL1 e KL2 em células do cumulus de complexos cumulus-oócito cultivados por 22 horas (n=4/tratamento). Letras diferentes indicam diferenças significativas com $p<0.05$. Dados são apresentados como a média dos valores (±S.E.M.) relativos a amostra calibradora calculado pelo método de ΔΔCt com correção da eficiência.

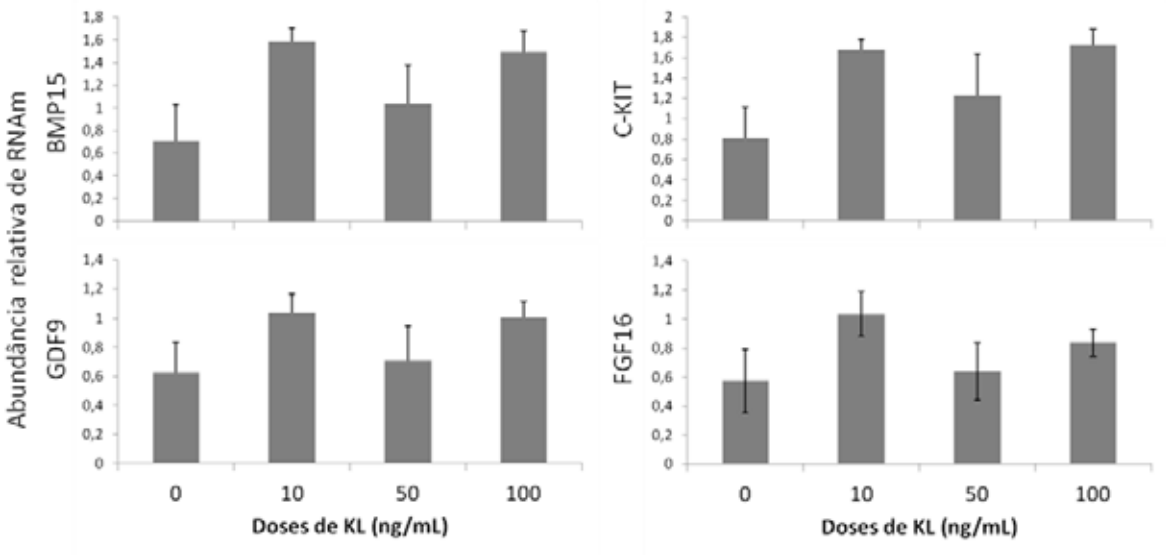

Figura 6: Efeito de doses crescentes de KL (0, 10, 50 e 100ng/ml) sobre a expressão relativa de RNAm de BMP15, GDF9, c-KIT e FGF16 em oócitos de complexos cumulus-oócito bovino cultivados por 22 horas (n=4). Dados são apresentados como a média dos valores (±S.E.M.) relativos a amostra calibradora calculado pelo método de ΔΔCt com correção da eficiência.

RESULTADOS COMPLEMENTARES

EFEITO DA INTERAÇÃO ENTRE FGF10 E BMP15 SOBRE A EXPRESSÃO DE KL1 E KL2 EM CÉLULAS DO CUMULUS BOVINAS

1.INTRODUÇÃO

Diante do fato de que o KL estimulou a progressão da meiose e de estudos prévios demonstrando que FGFs e BMP15 cooperam na regulação de aspectos importantes da diferenciação das células do cumulus como a atividade glicolítica (SUGIURA et al., 2007) e a expressão de receptores (NPR2) envolvidos no controle da meiose (ZHANG, M. et al., 2010), surgiu a hipótese de que os FGFs oocitários e a BMP15 poderiam interagir no controle da meiose via regulação da transcrição do KL nas células do cumulus. Os estudos sobre a interação da BMP15 com os FGFs foram iniciados focando-se o FGF10, sendo que estudos em curso investigam a interação entre a BMP15 e os FGFs 8 e 17.

Levando-se em consideração os efeitos distintos dos FSOs sobre cada uma das isoformas do KL (KL1 e KL2) conforme descrito no capítulo anterior, a expressão de ambas tem sido avaliada no estudo da interação entre a BMP15 e os FGFs. Além disso, como a expressão de ambas as isoformas mostrou-se crescente ao longo da MIV e com valores máximos atingidos às 12 horas do cultivo, decidiu-se pela investigação dos efeitos da BMP15, FGF10 e da combinação de ambos sobre a expressão dos RNAm do KL1 e do KL2 ao longo da MIV, mais precisamente às 4, 12 e 22 horas. Acredita-se que a análise ao longo do cultivo seja importante para que efeitos funcionalmente relevantes dos FSOs sobre a expressão do KL não sejam ignorados numa análise temporal pontual.

2.MATERIAL E MÉTODOS

Maturação in vitro

A maturação e a preparação do meio base de cultivo conforme descrito no capítulo dois.

Os CCOs foram divididos em grupos de 20 e submetidos à MIV por 4, 12 e 22 horas em meio de base de cultivo previamente descrito sem adição de fatores de crescimento (grupo controle) ou com adição de FGF10 (10ng/ml), BMP15 (100ng/ml) ou FGF10 (10ng/ml) com BMP15 (100ng/ml) (n=4 por

tratamento por momento de cultivo), COCs imaturos foram utilizados para representar 0 horas de cultivo

Análise da expressão gênica

Foi realizado conforme descrito no capítulo dois.

Análise estatística

Os dados de expressão gênica foram testados por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas com teste de Tukey-Kramer HSD. A análise estatística foi feita no software JMP (SAS Institute, Cary, NC, USA) e os resultados apresentados como média ± e erro padrão da média (SEM). Diferenças foram consideradas significativas quando $P<0.05$.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

O FGF10 sozinho não afetou a expressão do RNAm de nenhuma das isoformas do KL em nenhum dos três momentos avaliados. No capítulo anterior, o FGF10 inibiu a expressão do KL2 na dose de 100ng/ml, mas não na dose de 10 ng/mL utilizada neste estudo. Em estudos anteriores observamos que o FGF10 a 10ng/mL é capaz de estimular a expansão do cumulus e que esse efeito é perdido quando a dose é aumentada para 100 ng/mL (CAIXETA, 2012). Especula-se que o efeito inibitório do FGF10 sobre a expressão do KL2 observado anteriormente seja decorrente de dose excessiva e não tenha relevância fisiológica, A expressão do RNAm do KL2 não foi alterada por nenhum dos tratamentos no presente estudo (Fig. 1).

O tratamento com BMP15 elevou a expressão do RNAm do KL1 apenas às 22 horas de cultivo, de forma compatível com resultados anteriores. A combinação da BMP15 com o FGF10 estimulou a expressão do RNAm do KL1 em relação ao controle e aos tratamentos com BMP15 ou FGF10 separadamente às 12, mas não às 22 horas do cultivo. Embora, a combinação BMP15/FGF10 não tenha promovido aumento adicional da expressão do RNAm do KL1 em relação ao efeito da BMP15 sozinha às 22 horas de cultivo, os resultados presentes indicam que a interação entre esses FSOs é capaz de

antecipar o aumento da expressão do KL1 e potencialmente seus efeitos sobre o oócito durante a MIV.

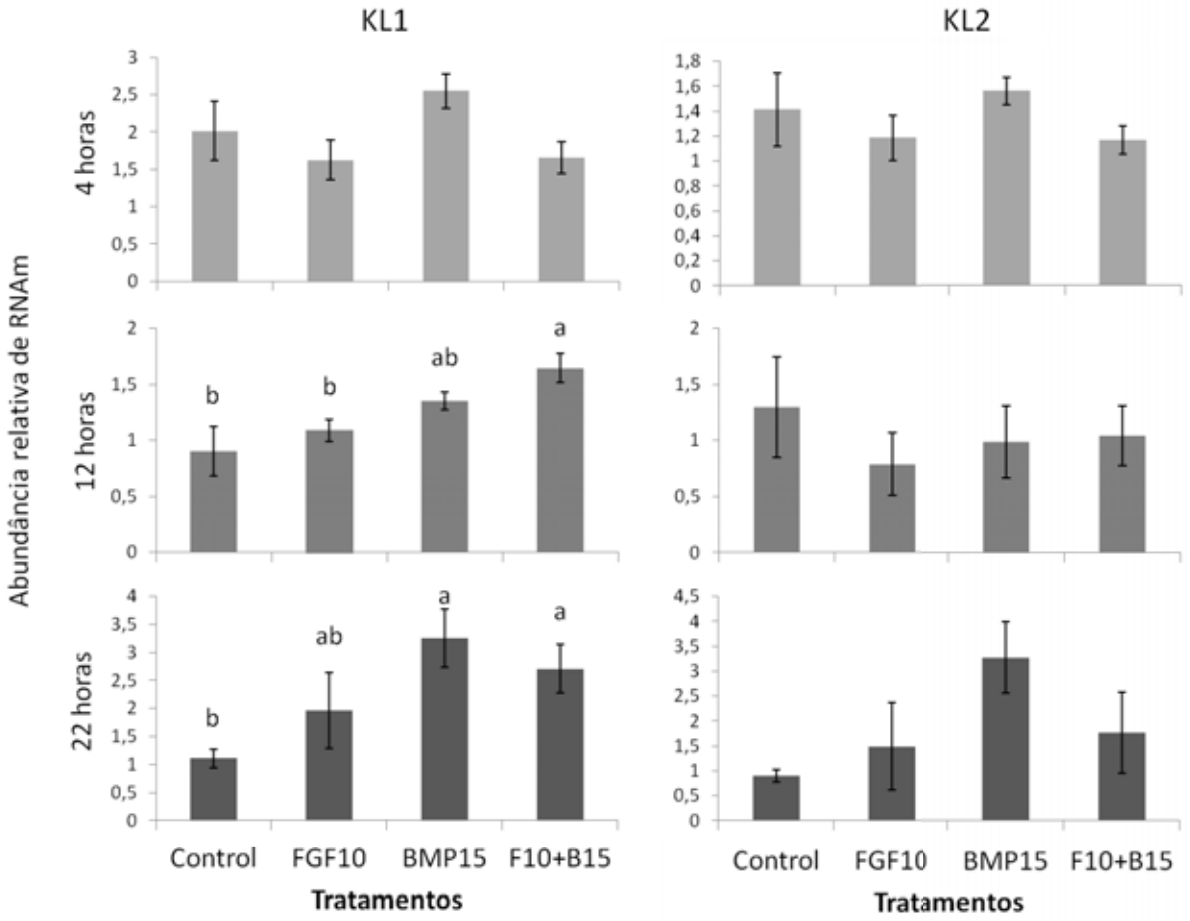

Figura 1: Efeitos do FGF10, BMP15 e da combinação de ambos sobre a expressão relativa dos RNAm do KL1 e do KL2 em diferentes momentos da MIV.(4, 12 e 22 horas, n=4 por tratamento por momento). Letras diferentes representam diferenças significativas (P<0,05). Dados são apresentados como a média dos valores (±S.E.M.) relativos a amostra calibradora calculado pelo método de ΔΔCt com correção da eficiência.

4.CONCLUSÃO

Em conclusão, os dados sugerem que a combinação da BMP15 com o FGF10 induz aumento antecipado da expressão do KL1 em células do cumulus durante a MIV bovina e que esses FSOs cooperam no controle da expressão do KL1 no CCO bovino.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando-se em consideração a importância da interação entre as células do cumulus e o oócito na diferenciação do complexo cumulus-oócito, este trabalho avaliou o padrão de expressão do KL ao longo da MIV, bem como seus efeitos sobre a expansão do cumulus e o progresso da meiose. Além disso, investigou-se a interação entre o KL e os principais fatores expressos no oócito bovino por meio da avaliação dos efeitos dos FSOs sobre a expressão do RNAm do KL nas células do cumulus, bem como dos efeitos do KL sobre a expressão dos RNAm dos FSO. Adicionalmente, investigamos os efeitos da interação entre o FGF10 e a BMP15 sobre a expressão do KL ao longo da MIV. Em resumo, foi demonstrado efeito positivo do KL sobre a progressão da meiose e que sua expressão é regulada diferentemente pelos FSO. Além disso, demonstrou-se que o FGF10 e a BMP15 interagem para estimular a expressão do KL nas células do cumulus.

Os resultados apresentados nesta dissertação contribuem para uma melhor compreensão das interações regulatórias entre o oócito e as células do cumulus e estimulam novos estudos sobre ações sinérgicas envolvendo outros fatores oocitários na regulação de diferentes aspectos da diferenciação do CCO. Por fim, estudos dessa natureza, por permitirem um melhor entendimento da rede de comunicação entre o oócito e as células do cumulus e da regulação de vários aspectos cruciais da diferenciação do CCO deverão possibilitar o aprimoramento de estratégias para o controle da fertilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

AI, J-S.; LI, M., SCHATTEN, H.; SUN, Q-Y. Regulatory mechanism of spindle movements during oocyte meiotic division. **Asian Aust J Anim Sci,** v. 22, p. 1447-1486, 2009.

ALBERTINI, D. F., COMBELLES, C. M., BENECCHI, E.; CARABATSOS, M. J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction***,* v. 121, p.647-53, 2001.

AMOUR, A., KNIGHT, C. G., ENGLISH, W. R., WEBSTER, A., SLOCOMBE, P. M., KNÄUPER, V., DOCHERTY, A. J., BECHERER, J. D., BLOBEL, C.P.; MURPHY, G.. The enzymatic activity of ADAM8 and ADAM9 is not regulated by TIMPs. **FEBS Lett***,* v. 524**,** p. 154-8. 2002.

BALTUS, A.E.; MENKE, D.B.; HU, Y.C.; GOODHEART, M.I.; CARPENTER, A.E.; de ROOIJ, D.G., PAGE, D.C. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. **Nat Genet**, v. 38, p. 1430-1434, 2006.

BERISHA, B.; SINOWATZ, F.; SCHAMS, D. 2004. Expression and localization of fibroblast growth factor family members during the final growth of bovine ovarian follicles. **Mol Reprod Dev**, v.67, p.162-171.

BLOBEL, C. P. ADAMs: key players in EGFR-signaling and development. **Nature***.* v. 6, p.32-43, 2005.

BODENSTEINER, K.J.; CLAY, C.M.; MOELLER C.L.; SAWYER H.R. 1999. Molecular cloning of the ovine Growth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. **Biol Reprod**, v.60, p.381-386.

BOWLES, J.; KNIGHT, D.; SMITH, C.; WILHELM, D.; RICHMAN, J.; MAMIYA, S.; YASHIRO, K.; CHAWENGSAKSOPHAK, K.; WILSON, M.J.; ROSSANT, J.; HAMADA, H.; KOOPMAN, P. Retinoid signaling determines germ cells fate in mice. **Science**, v. 312, p. 596-600, 2006.

BRANNAN, C. I., LYMAN, S. D., WILLIAMS, D. E., EISENMAN, J., ANDERSON, D. M., COSMAN, D., BEDELL, M. A., JENKINS, N. A.; COPELAND, N. G. STEEL-DICKIE mutation encodes a c-KIT ligand lacking transmembrane and cytoplasmic domains. **Proc Natl Acad Sci U S A***,* v.88, p. 4671-4, 1991.

BUCCIONE, R., SCHROEDER, A. C.; EPPIG, J. J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biol Reprod***,* v. 43, p. 543-547, 1990.

BURATINI, J., PINTO, M. G., CASTILHO, A. C., AMORIM, R. L., GIOMETTI, I. C., PORTELA, V. M., NICOLA, E. S.; PRICE, C. A. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. **Biol Reprod***,* v. 77, p. 743-750, 2007.

BURATINI, J., TEIXEIRA, A. B., COSTA, I. B., GLAPINSKI, V. F., PINTO, M. G., GIOMETTI, I. C., BARROS, C. M., CAO, M., NICOLA, E. S.; PRICE, C. A.. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. **Reproduction***,* v. 130, p. 343-350. 2005

CAIXETA, E. S. 2012. **Regulação da expressão de fatores secretados pelo oócito(FSOs) e seus receptores durante a maturação *in vitro* (MIV) bovina e ações no controle da expansão do cumulus**. 2012. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

CHO, J-H.; ITOH, T.; SENDAI, Y.; HOSHI, H. Fibroblast growth factor 7 stimulates in vitro growth of oocytes originating from bovine early antral follicles. **Mol Reprod Dev**, v.75, p.1736-1743, 2008.

CHELLAIAH, A. T.; MCEWEN, D.G.; WERNERN S.; XU, J.; ORNITZ DM. Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 3: Alternative splicing in immunoglobulin-like domain III creates a receptor highly specific for acidic FGF/FGF-1. **J Biol Chem**, v. 269, p. 11620-11627. 1994.

CONTI, M., ANDERSEN, C. B., RICHARD, F., MEHATS, C., CHUN, S. Y., HORNER, K., JIN, C.; TSAFRIRI, A. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Mol Cell Endocrinol***,* v. 187, p. 153-159, 2002.

CRAWFORD, J.L.; MCNATTY, K. P. The ratio of growth differentiation factor 9: Bone morphogenetic protein 15 mRNA expression is tightly co-regulated and differs between species over a wide range of ovulation rates. **Mol Cell Endocrinol**, v. 348, p. 339-343. 2012.

DE PRADA, J. K., HILL, D. L., CHAFFIN, C. L.; VANDEVOORT, C. A. Nuclear maturation and structural components of nonhuman primate cumulus-

oocyte complexes during in vivo and in vitro maturation. **Fertil Steril**, v. 91, 2043-2050, 2009.

DONG, J.; ALBERTINI, D.F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T.R.; LU, N.; MATZUK, M.M. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature,** v.383, p.531-535.

DOWNS, S. M.; HUNZICKER-DUNN, M. Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte-cumulus cell complex by site-selective analogs of cyclic adenosine monophosphate. **Dev Biol**, v. 172, p. 72-85. 1995.

ELVIN, JA; YAN, C; WANG, P; NISHIMORI, K; MATZUK, MM. 1999. Molecular characterization of the follicle defects in growth differentiation. **Mol Endocrinol**, v. 13, p. 1018-1034.

EPPIG, J.J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**; v.122, p.829-838.

FERREIRA, E. M., VIREQUE, A. A., ADONA, P. R., MEIRELLES, F. V., FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, p. 836-848, 2009.

FLANAGAN, J. G.; LEDER, P. The kit ligand: a cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts. **Cell**, v. 63, 185-194, 1990.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Anim Reprod Sci**, v. 78, 135-163, 2003.

FORTUNE, J.E. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Anim Reprod Sci**, v.78, p.135-163.

GILCHRIST, R. B., LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Hum Reprod Update**, v. 14, 159-177, 2008.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J. Differences in the participation of TGFB superfamily signalling pathways mediating porcine and murine cumulus cell expansion. **Reproduction**, v. 142, p. 6476-57, 2011.

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Anim Reprod Sci**, v.82-83, p.431-446, 2004.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** 2°ed, Editora Roca. 2008 p. 265.

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal***,* v. 33, p. 12, 2010.

GUI, L-M.; JOYCE, I.M. 2005. RNA interference evidence that growth differentiation factor-9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice. **Biol Reprod**, v.72, p.195-199.

HOOPER, N. M., KARRAN, E. H. AND TURNER, A. J. Membrane protein secretases. **Biochem J**, v. 15, p. 265-179, 1997.

HOSOE, M.; KANEYAMA, K.; USHIZAWA, K.; HAYASHI, K-G.; TAKAHASHI, T. 2011. Quantitative analysis of bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth differentiation factor 9 (GDF9) gene expression in calf and adult bovine ovaries. **Reprod Biol Endocrinol** v. 9, p. 33.

HSIEH, M.; CONTI, M. 2005. G-protein-coupled receptor signaling and the EGF network in endocrine systems. **Trends Endocrinol Metab** v. 16, p. 320-326.

HUANG, E. J., NOCKA, K. H., BUCK, J; BESMER, P. Differential expression and processing of two cell associated forms of the kit-ligand: KL-1 and KL-2. **Mol Biol Cell***,* v. 3, p. 349-362, 1992.

HUSSEIN, T.S.; THOMPSON, J.G.; GILCHRIST, R.B. 2006. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Dev Biol**, v.296, p.514-521.

HUTT, K. J., MCLAUGHLIN, E. A.; HOLLAND, M. K. Kit ligand and c-KIT have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. **Mol Hum Reprod***,* v. 12, p. 61-69, 2006a.

HUTT, K.J.; McLAUGHLIN, E.A.; HOLLAND, M.K. Kit/kit ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. **Biol Reprod**, v. 75, p.421-433,2006b.

IGARASHI, M.; FINCH, P.W.; AARONSON, S.A. Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF10) reveals functional

similarities with keratinocyte growth factor (FGF7). **J Biol Chem**, v.273, p.13230-13235, 1998.

ISMAIL, R.S.; DUDÉ, M.; VANDERHYDEN, B.C. Hormonally regulated expression and alternative splicing of kit ligand may regulate kit-induced inhibition of meiosis in rat oocytes. **Dev Biol**, v.184, p.333-342, 1997.

ISMAIL, R.S.; OKAWARA, Y.; VANDERHYDEN, B.C. Hormonal regulation of the kit ligand for c-KIT in the rat ovary and its effects on spontaneous oocyte meiotic maturation. **Mol Reprod Dev**, v.43, p.458-469, 1996.

ITOH, N.; ORNITZ, D.M.. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. **Trends Genet**; v.20, p.563-569, 2004

JIN, X.; HAN, C-S; YU, F-G; WEI, P; HU, Z-Y; LIU, Y-X. 2004. Anti-Apoptotic Action of Stem Cell Factor on Oocytes in Primordial Follicles

JOYCE, I. M., PENDOLA, F. L., WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J. J. Oocyte regulation of kit ligand expression in mouse ovarian follicles. **Dev Biol***,* v. 214, p. 342-53, 1999.

JUENGEL, J.L.; BODENSTEINER, K.J.; HEATH, D.A.; HUDSON, N.L.;MOELLER, C. L.; SMITH, P.; GALLOWAY, S.M.; DAVIS, G.H.; SAWYER, H.R.; MCNATTY, K.P. 2004. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. **Anim Reprod Sci**, v.82–83, p.447–460.

JUENGEL, J.L.; MCNATTY, K.P. 2005. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. **Hum Reprod Update**, v.11, p.143-60.

KAWAGUCHI, N., HORIUCHI, K., BECHERER, J. D., TOYAMA, Y., BESMER, P.; BLOBEL, C. P. Different ADAMs have distinct influences on Kit ligand processing: phorbol-ester-stimulated ectodomain shedding of Kitl1 by ADAM17 is reduced by ADAM19. **J Cell Sci***,* v. 120, 943-52, 2007.

KEZELE, P.; NILSSON, E.E.; SKINNER, M.K. Keratinocyte growth factor acts as mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. **Biol Reprod**, v.73, p.967-973, 2005.

KIDDER, G. M.; MHAWI, A. A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. **Reproduction***,* v. 123, p. 613-620, 2002.

KIDDER, G. M.; VANDERHYDEN, B. C. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. **Can J Physiol Pharmacol***,* v. 88, 399-413, 2010.

KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. 2006. TGF-β superfamily members and ovarian follicle development. R**eproduction**, v.132, p. 191-206

KOTANI, T.; YAMASHITA, M. Discrimination of the roles of MPF and MAP kinase in morphological changes that occur during oocyte maturation. **Dev Biol***,* v. 252, p. 271-286, 2002.

KOUBOVA J.; MENKE, D.B.; ZHOU, Q.; CAPEL, B.; GRISWOLD, M.D.; PAGE, D.C. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. **Proc Natl Acad Sci U. S. A**. v. 103, p. 2474-2479, 2006.

LI, G. P., LIU, Y., BUNCH, T. D., WHITE, K. L.; ASTON, K. I. Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase I to metaphase III. **Mol Reprod Dev***,* v. 71, 220-226, 2005.

LI, R.; NORMAN, R.J.; ARMSTRONG, D.T.; GILCHRIST, R.B. 2000. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulose cells and cumulus cells. **Biol Reprod**, v.63, p.839-845.

LIM, J. J., EUM, J. H., LEE, J. E., KIM, E. S., CHUNG, H. M., YOON, T. K., KIM, K. S.; LEE, D. R. Stem cell factor/c-KIT signaling in in vitro cultures supports early mouse embryonic development by accelerating proliferation via a mechanism involving Akt-downstream genes. **J Assist Reprod Genet***,* v. 27, 619-627, 2010.

LINTERN-MOORE, S; MOORE, G.P.M. The Initiation of Follicle and Oocyte Growth in the Mouse Ovary. **Biol Reprod**, v. 20, p.773-778, 1979.

LIU, K., RAJAREDDY, S., LIU, L., JAGARLAMUDI, K., BOMAN, K., SELSTAM, G.; REDDY, P. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. **Dev Biol***,* v. 299, p. 1-11, 2006.

MACHADO, F. M. 2012. **Expressão e função de membros das subfamílias fgf-8 e fgf-9 em folículos antrais bovinos**. 2012. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

MACHADO, M. F., PORTELA, V. M., PRICE, C. A., COSTA, I. B., RIPAMONTE, P., AMORIM, R. L. & BURATINI, J. Regulation and action of fibroblast growth factor 17 in bovine follicles. **J Endocrinol***,* v. 202, 347-53, 2009.

MAMO, S., CARTER, F., LONERGAN, P., LEAL, C. L., AL NAIB, A., MCGETTIGAN, P., MEHTA, J. P., EVANS, A. C.; FAIR, T. Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and in vitro matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. **BMC Genomics***,* v. 12, p. 151. 2011.

MCNATTY, K.P.; MOORE, L.G.; HUDSON, N.L.; QUIRKE, L.D.; LAWRENCE, S.B.; READER, K.; HANRAHAN, J.P.; SMITH, P.; GROOME, N.P.; LAITINEN, M.; RITVOS, O.; JUENGEL, J.L. 2004. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. **Reproduction**, v.128, p.379-386.

MEINECKE, B., JANAS, U., PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reprod Domest Anim***,* v. 36, p. 183-188, 2001.

MENDEZ, R. & RICHTER, J. D. Translational control by CPEB: a means to the end. **Nat Rev Mol Cell Biol***,* v. 2, p. 521-529, 2001.

MÉNÉZO, Y. J.; HÉRUBEL, F. Mouse and bovine models for human IVF. **Reprod Biomed Online***,* v. 4, p. 170-175, 2002.

MERKWITZ, C., LOCHHEAD, P., TSIKOLIA, N., KOCH, D., SYGNECKA, K., SAKURAI, M., SPANEL-BOROWSKI, K.; RICKEN, A. M. Expression of KIT in the ovary, and the role of somatic precursor cells. **Prog Histochem Cytochem,** v. 46, p. 131-184, 2011.

MIYAZAWA, K., WILLIAMS, D. A., GOTOH, A., NISHIMAKI, J., BROXMEYER, H. E. & TOYAMA, K. Membrane-bound Steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of c-KIT gene-encoded protein than its soluble form. **Blood***,* v. 85, p. 641-649, 1995.

MIYOSHI, T.; OTSUKA, F.; NAKAMURA, E.; INAGAKI, K.; OGURA-OCHI, K.; TSUKAMOTO, N.; TAKEDA, M.; MAKINO, H. 2012. Regulatory role os kit ligand-c-KIT interaction and oocyte factors in steroidogenesis by rat granulose cells. **Mol Cell Endocrinol** Accepted Manuscript. DOI: 10.1016/j.mce.2012.02.011.

MIYOSHI, T.; OTSUKA, M.; YAMASHITA, K.; INAGAKI, E.; NAKAMURA, N.; TSUKAMOTO, M.; TAKEDA, M.; SUZUKI, J.; MAKINO, H. Functional relationship between fibroblast growth factor-8 and bone morphogenetic

proteins in regulating steroidogenesis by rat granulose cells. **Mol Cell Endocrinol** v.325, p. 84-92, 2010.

MOHAMMADI, M.; OLSEN, S. K.; GOETZ, R. A protein canyon in the FGF–FGF receptor dimer selects from an a` la carte menu of heparan sulfate motifs. **Current Opin Struc Biol,** v. 15, p. 506-516. 2005a.

MOHAMMADI, M.; OLSEN, S.K.; IBRAHIMI, O. A. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. **Citokine Growth Factor Reviews**, v. 16, p. 107-137. 2005b.

NEZU, M.; TOMONAGA, T.; SAKAI, C.; ISHII, A.; ITOGA, S.; NISHIMURA, M.; MATSUO, Y.; TAGAWA, M.; NOMURA, F. Expression of the fetal-oncogenic fibroblast growth factor- 8/17/18 subfamily in human hematopoietic tumors, **Biochem Biophys Res Commun,** v.335 p.843–849. 2005.

ORNITZ, D.M.; XU, J.; COLVIN, J. S.; MCEWEN, D. G.; MACARTHUR, G. A.; COULIR, F.; GAO, G.; GOLDFARB, M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. **J Biol Chem**, v. 271, p. 15292-15297. 1996.

OTOI, T., YAMAMOTO, K., KOYAMA, N., TACHIKAWA, S.; SUZUKI, T. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. **Theriogenology***,* v. 48, p. 769-774, 1997.

OTSUKA, F.; MCTAVISH, K.; SHIMASAKI, S. Integral role of GDF9 and BMP15 in ovarian function. **Mol Reprod Dev** v.78, p.9-21, 2011.

PARROTT, J.A.; SKINNER, M.K. 1999. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Endocrinology**, v.140, p.4262-4270

PARROTT, J.A.; SKINNER, M.K. 2000. Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. **Mol Reprod Dev**, v.55, p.55-64.

PARROTT, J.A.; SKINNER, M.K. Thecal cell-granulosa cell interactions involve a positive feedback loop among keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor, and kit ligand during ovarian follicular development. **Endocrinology**, v.139, p.2240-2245. 1998.

REGASSA, A., RINGS, F., HOELKER, M., CINAR, U., THOLEN, E., LOOFT, C., SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Transcriptome dynamics and

molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cells. **BMC Genomics***,* v. 12, p. 57, 2011.

REYNAUD, K.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; BERNEX, F.; PANTHIER, J.J.; DRIANCOURT, M.A. Alterations in ovarian function of mice with reduced amounts of kit receptor. **Reproduction**, v. 121, p. 229-237, 2001.

REYNAUD, K.; DRIANCOURT, M.A. Oocyte attrition. **Mol Cel Endocrinol**, v. 163, p. 101-108, 2000.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implication for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol Reprod Dev,** v. 61, p. 234-248. 2002

ROBINSON, J.W.; ZHANG, M.; SHUHAIBAR, L.C.; NORRIS, R.P.; GEERTS, A.; WUNDER, F.; EPPIG, J.J.; POTTER, L.R.; JAFFE, L.A. Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes. **Dev Biol**, v. 366 p. 308-316, 2012.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Bioch Biophys Acta** 2012 doi:10.1016/j.bbadis.2012.05.013.

SCARAMUZZI, R. J., BAIRD, D. T., CAMPBELL, B. K., DRIANCOURT, M. A., DUPONT, J., FORTUNE, J. E., GILCHRIST, R. B., MARTIN, G. B., MCNATTY, K. P., MCNEILLY, A. S., MONGET, P., MONNIAUX, D., VIÑOLES, C.; WEBB, R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. **Reprod Fertil Dev***,*v. 23, 444-467, 2011.

SCHATTEN, H.; SUN, Q. Y. 2011. Centrosome dynamics during mammalian oocyte maturation with a focus on meiotic spindle formation. **Mol Reprod Dev***,* v. 78, p. 757-768, 2011

SCHLÖNDORFF, J.; BLOBEL, C. P. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins shedding. **J. Cell. Sci***.* v.112, p. 3603-3617, 1999.

SELA-ABRAMOVICH, S., CHOREV, E., GALIANI, D.; DEKEL, N. Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. **Endocrinology***,* v. 146, 1236-1244, 2005.

SHIMADA, M., HERNANDEZ-GONZALEZ, I., GONZALEZ-ROBAYNA, I.; RICHARDS, J. S. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. **Mol Endocrinol***,* v. 20, p. 1352-1365, 2006.

SHIMASAKI, S.; MOORE, R.K.; OTSUKA, F.; ERICKSON, G.F. 2004. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. **Endocrinol Rev**, v.25, p. 72-101.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology***,* v. 55, p. 1241-54, 2001.

SKINNER, M.K. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Hum Reprod Update**, v.11, p.461-47, 2005.

SUGIURA, K.; SU Y.; DIAZ, F.J.; PANGAS, S.A.; SHARMA, S.; WIGGLESWORTH, K.; O'BRIEN, M.J.; MATZUK, M.M.; SHIMASAKI, S.; EPPIG J.J. 2007. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. **Development**, v.134, p.2593-2603.

SUGIURA, K.; SU, Y.Q.; WIGGLESWORTH, K.; MATZUK, M.M.; EPPIG, J.J. Estrogen promotes the development of mouse cumulus cells in coordination with oocyte-derived GDF9 and BMP15. **Mol Endocrinol**, v. 24(12), p. 2303-3214. 2010.

SUN, Q Y et al. 2001. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation , fertilization and early embryo development in vitro. **North,** p.155-163, 2001.

TAJIMA, Y., MOORE, M. A., SOARES, V., ONO, M., KISSEL, H.; BESMER, P. Consequences of exclusive expression in vivo of Kit-ligand lacking the major proteolytic cleavage site. **Proc Natl Acad Sci U S A***,* v. 95, 11903-11908, 1998.

TEILMANN, S. C. Differential expression and localisation of connexin-37 and connexin-43 in follicles of different stages in the 4-week-old mouse ovary. **Mol Cell Endocrinol***,* v. 234, p. 27-35, 2005.

THOMAS, F. H.; VANDERHYDEN, B. C. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. **Reprod Biol Endocrinol***,* v. 4, p. 19, 2006.

TOMEK, W., TORNER, H.; KANITZ, W. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. **Reprod Domest Anim***,* v. 37, p. 86-91, 2002.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; BECKERS, J.F. 1997. In-vivo and in-vitro development of preantral follicles. **Theriogenology**, v.47, p.73-82, 1997.

VITT, U.A.; MAZERBOURG, S.; KLEIN, C.; HSUEH, A.J.; Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. Biol Reprod, v. 67(2), p. 473-480. 2002.

WEBB, R. J., MARSHALL, F., SWANN, K.; CARROLL, J. Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in [cAMP] and protein kinase a in mammalian oocytes. **Dev Biol***,* v. 246, p. 441-454, 2002.

WU, Y. G., ZHOU, P., LAN, G. C., GAO, D., LI, Q., WEI, D. L., WANG, H. L.; TAN, J. H. MPF governs the assembly and contraction of actomyosin rings by activating RhoA and MAPK during chemical-induced cytokinesis of goat oocytes. **PLoS One***,* v. 5, p. e12706, 2010.

XU, N., LAO, Y., ZHANG, Y.; GILLESPIE, D. A. Akt: a double-edged sword in cell proliferation and genome stability. **J Oncol***,* p. 951724, 2012.

YAN, C.; WANG, P.; DEMAYO, J.; DEMAYO, F.J.; ELVIN, J.A.; CARINO, C.; PRASAD, S.V.; SKINNER, S.S.; DUNBAR, B.S.; DUBE, J.L.; CELESTE, A.J.; MATZUK, M.M. 2001. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. **Mol Endocrinology**, v.15, p.854-866.

YE, Y., KAWAMURA, K., SASAKI, M., KAWAMURA, N., GROENEN, P., GELPKE, M. D., RAUCH, R., HSUEH, A. J. & TANAKA, T. Kit ligand promotes first polar body extrusion of mouse preovulatory oocytes. **Reprod Biol Endocrinol***,* v. 7, p. 26, 2009.

YOSHINO, O.; MCMAHON, H.E.; SHARMA, S.; SHIMASAKI, S. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological

functions of BMP-15 in the mouse. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 103, p. 10678-10683, 2006.

ZHANG, K., HANSEN, P. J.; EALY, A. D. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. **Reproduction***,* v. 140, p. 815-826, 2010.

ZHANG, M., OUYANG, H.; XIA, G. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. **Mol Hum Reprod***,* v. 15, 399-409, 2009.

ZHANG, M.; SU, Y.Q.; SUGIURA, K.; WIGGGLESWORTH, K.; XIA, G.; EPPIG, J.J. Estradiol promotes and mantains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro, **Endocrinology**, v. 152, p. 4377-4385, 2011.

ZHANG, M.; SU, Y.Q.; SUGIURA, K.; XIA, G.; EPPIG, J.J. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes, **Science,** v. 330, p. 366-369, 2010.

ZHANG, X.; IBRAHIMI, O. A.; OLSEN, S. K.; UMEMORI, H.; MOHAMMADI, M.; ORNITZ, D. M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family.The complete mammalian FGF family. **J Biol Chem**, v.281, p.15694-15700, 2006.

ZHOU, J. H., HIKONO, H., OHTAKI, M., KUBOTA, T.; SAKURAI, M. Cloning and characterization of cDNAs encoding two normal isoforms of bovine stem cell factor. **Biochim Biophys Acta***,* v. 1223, p. 148-50,1994.