

# SINALIZAÇÃO POR INSULINA DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS\*

Edgar Mauricio Mogollón-Waltero<sup>1+</sup>, Cristiano Calixto<sup>1</sup>, Daniela Fantini Vale<sup>1</sup>, Janaina Leite Pereira<sup>1</sup>, Aline Glória Curcio<sup>1</sup>, Carlos Logullo<sup>2</sup>, Angelo José Burla Dias<sup>2</sup> e Helga Fernandes Gomes<sup>1</sup>

**ABSTRACT.** Mogollón-Waltero E.M., Calixto C., Vale D.F., Pereira J.L., Curcio A.G., Logullo C., Dias A.J.B. & Gomes H.F. [**Insulin signaling during in vitro maturation of bovine oocytes**]. Sinalização por insulina durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(Supl. 1):12-20, 2013. Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, CCTA, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ 28013-602, Brasil. E-mail: mao5\_2000@yahoo.com

The oocyte maturation is a process tightly regulated by a cascade of enzymatic events based on several ways of phosphorylation and dephosphorylation as a means to activity control of many enzymes involved in this pathway. In general, the results of the research has shown that there is an influence of insulin-signaling pathway in the maturation of bovine oocytes and that the deepening of this study may contribute significantly to the improvement of in vitro production of bovine embryos. It has been shown that the phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) participates in this process regulating the activity of important reactions related to the resumption of meiosis. The inhibition of PI3K could affect events of actin microfilaments polarization and depolarization leading to produce changes in the movement patterns of leading cellular organelles. Taken together the evidences demonstrated until now reinforce the hypothesis about involvement of insulin on oocyte maturation in bovines.

**KEY WORDS.** Insulin pathway, oocyte maturation, phosphatidylinositol 3 kinase.

**RESUMO.** A maturação oocitária é um processo bem regulado por uma cascata de eventos enzimáticos baseado em vários processos de fosforilação e desfosforilação como forma de controle da atividade de muitas das enzimas envolvidas nessa via. De uma forma geral, os resultados das pesquisas tem mostrado que há uma influência da via de sinalização por insulina (PI3K/AKT) na maturação dos oócitos bovinos e que o aprofundamento desse estudo poderá contribuir significativamente para a melhoria da produção *in vitro* de embriões bovinos. Tem sido demonstrado que a fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K) participa nesse processo, regulando a atividade de importantes reações relacionadas à

retomada da meiose. A inibição de PI3K pode afetar os eventos de polarização e despolarização dos microfilamentos de actina levando a produzir mudanças nos padrões de movimentação das principais organelas celulares. O conjunto destes resultados reforça a hipótese do envolvimento da cascata de Insulina na maturação oocitária em bovinos.

**PALAVRAS-CHAVE.** Cascata da insulina, fosfatidilinositol 3 quinase, maturação oocitária.

## INTRODUÇÃO

O objetivo da maturação oocitária, seja ela *in vivo* ou *in vitro*, é a obtenção de um oócito competente para continuar com sucesso a fertilização e

\*Recebido em 13 de abril de 2013.

Aceito para publicação em 23 de setembro de 2013.

<sup>1</sup> Médico-veterinário, MSc. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Av. Alberto Lamego 2000, Horto, Campos dos Goytacazes, RJ 25959-215 Brasil. +Autor para correspondência. E-mail: mao5\_2000@yahoo.com

<sup>2</sup> Médico-veterinário, DSc. CCTA, UENF, Av. Alberto Lamego 2000, Horto, Campos dos Goytacazes, RJ 25959-215.

posterior produção de um embrião viável. As pesquisas realizadas nessa área afirmam que os oócitos aspirados de folículos antrais evoluem facilmente até metáfase II em cultivo e podem ser fertilizados, mas seu potencial de desenvolvimento após fertilização é muito baixo. Diante disso, evidencia-se que as condições *in vitro* são inferiores das *in vivo* por razões ainda não esclarecidas (Fulka et al. 1998, Varago et al. 2008).

O processo de maturação compreende duas etapas principais: primeiro a maturação nuclear que envolve a condensação do material nuclear para formar os cromossomos, seguida por dois ciclos meióticos; e segundo, a maturação citoplasmática, que compreende a redistribuição de organelas (Szollosi 1993, Mermillod et al. 2008). Oócitos imaturos tornam-se ovos férteis pelo processo chamado maturação meiótica que é induzido pela ativação de vias de transdução de sinais específicas que convergem para ativar o fator promotor da maturação (MPF), o qual é a chave da atividade que catalisa a entrada na fase-M da meiose I e meiose II (Schmitt et al. 2002, Pradeep et al. 2009).

A cascata de Insulina tem sido muito relacionada com o metabolismo energético celular pela ação já conhecida sobre a glicogênio sintase quinase 3 (GSK3), que está envolvida na síntese de glicogênio. Mas a enzima PI3K está inserida em outras ações que podem afetar o desenvolvimento oocitário como a regulação das quantidades de cAMP, que mantém a parada meiótica e a remodelação do citoesqueleto para a movimentação de organelas, necessárias para a maturação do oócito (Jagarlamudi et al. 2009).

Nesse contexto nosso objetivo foi revisar os eventos relacionados à maturação oocitária com ênfase na participação de enzimas da cascata de insulina destacando a PI3K nesse processo.

## DESCRIÇÃO DAS VIAS PI3K/AKT e MAPK

As vias de sinalização da PI3K/AKT e MAPK (Raf/MEK/ERK) são pontos cruciais onde convergem múltiplos sinais de sobrevivência celular. Em diversos tipos celulares a PI3K e seu principal alvo, a proteína quinase B (PKB), também chamada de AKT, são mediadores de sinais de sobrevivência, diferenciação e proliferação celular (Zhou et al. 1998, Huang & Reichardt 2001, Zheng & Liu 2011). A família das PI3Ks é formada por um complexo heterodimérico compreendido por uma subunidade reguladora de 85 kDa e uma catalítica de 110 kDa, encarregada da

fosforilação de lipídios de inositol gerando 3-fosfoinosítoles (PI(3)P, PI(3, 4)P2 e PI(3, 4, 5)P3). Estes se unem a uma grande variedade de moléculas de sinalização, alterando sua atividade e localização subcelular (Leevers et al. 1999). As PI3Ks estão envolvidas em várias funções celulares que incluem crescimento celular, proliferação, diferenciação, mobilidade, sobrevivência e tráfico intracelular. Elas são expressas tanto nos oócitos quanto nas células do cumulus e possuem importante papel na maturação oocitária dos mamíferos (Park et al. 2011).

A família das fosfatidil inositol 3 quinases (PI-3Ks) está dividida em quatro grupos (IA, IB, II, e III) de acordo com suas características estruturais e substratos específicos. Dessas, somente as enzimas da classe I catalisam a produção de PI(3,4,5)P3 e PI(3,4)P2 *in vivo* (Kumar et al. 2011). Nos mamíferos, há três classes de PI3K. (Zhou et al. 2011, Vivanco & Sawyers 2002). PIP3 atua como um segundo mensageiro intracelular que participa na ativação da AKT pela sua fosforilação, a AKT se torna ativa e pode inibir diversos alvos, resultando em crescimento celular, sobrevivência e proliferação através de distintos mecanismos. PI3K tem mostrado ser reguladora da atividade de outros alvos celulares, tais como a quinase induzível por soro e glicocorticóides (SGK), as pequenas proteínas de ligação GTP-Rac1 e Cdc42, e a proteína quinase C (PKC), numa forma AKT independente por meio de mecanismos ainda não caracterizados (Figura 1). A atividade destes alvos conduz a sobrevivência celular, rearranjo e transformação do citoesqueleto e patogênese de grande número de enfermidades incluindo as neoplasias (Franke et al. 2003, Vivanco & Sawyers 2002). O produto da PI3K, conhecido como PIP3 tem sido reconhecido constantemente nos embriões desde o estágio de uma célula até o blastocisto (Zheng & Liu 2011).

A regulação da sobrevivência por PI3K, em particular, está mediada pela ativação da AKT, que requer sua translocação para a membrana plasmática e fosforilação na treonina 308 (Thr 308) e na serina 473 (Ser 473) (Scheid et al. 2002). Os alvos da AKT são diversos e têm sido associados com respostas metabólicas e de sobrevivência celular, resultando na inativação de mediadores pró-apoptóticos (Bad, Bax, caspasa 9, fator de transcrição Forkhead, GSK3 e P53) e a ativação de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, IAP e mTOR) que em conjunto vão determinar as diversas funções desta via (Figura 1) (Dudek et al. 1997, Brunet et al. 2001).

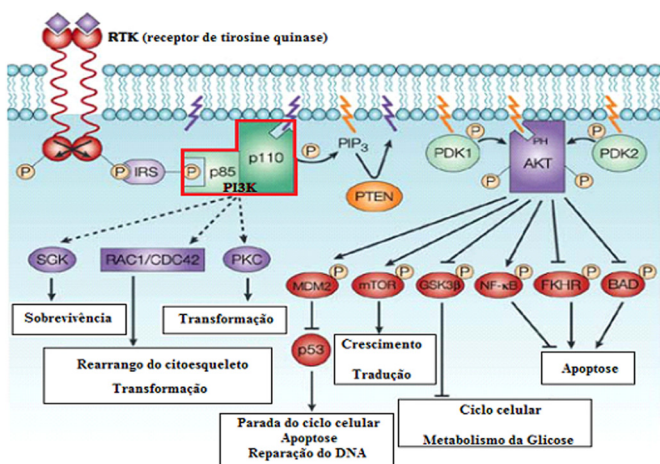


Figura 1. Esquema da via de sinalização de PI3K. Substrato do receptor de insulina (IRS), P85 (Subunidade reguladora da PI3K), P110 (Subunidade catalítica da PI3K), fosfo inositol fosfato (PIP), homólogo da fosfatase e tensina (PTEN), fosfo inositide 3 dependente de quinases (PDK), proteína quinase B (AKT/PKB), quinase induzida por soro e glicocorticoides (SGK), pequena proteína G da subfamília Ras correspondente à família Rho de GTPases (RAC1), proteína do controle da divisão celular 42 (CDC42), proteína quinase C (PKC), oncogene murino “double minute” (MDM2), proteína supressora de tumor 53 (P53), proteína alvo da rapamicina (mTOR), Glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK3 $\beta$ ), fator nuclear capa B (NF $\kappa$ B), família de fatores de transcrição Forkhead (FKHR) e proteína pró-apoptótica da família BCL2 (BAD) (Adaptado de: Vivanco & Sawyers 2002).

As MAPK são enzimas muito conservadas evolutivamente que respondem a estresses físicos e químicos, controlando a sobrevivência e adaptação, e estão implicadas em processos de crescimento e diferenciação. Sua atividade está regulada pela cascata composta pela MAPK, MAPK quinase (MAPKK, MKK ou MEK), e as MAPKK quinase ou MEK quinases (MAPKKK ou MEKK). Nos mamíferos existem três grupos de MAPK: ERK, p38 e JNK. As MAPK participam em múltiplos processos celulares como diferenciação celular, movimentação de organelas, proliferação celular e apoptose. (Schaeffer & Weber 1999, Wagner & Nebreda 2009). A via de sinalização da ERK foi a primeira via de sinalização de MAPK estudada em mamíferos. A ativação das pequenas proteínas G leva a ativação da via das MAPKs assim: Ras/Raf/MEK/ERK para governar os processos de proliferação, diferenciação, angiogênese e sobrevivência celular (Kolch 2000, Wilhelm et al. 2004).

## MATURAÇÃO IN VITRO DOS OÓCITOS

A produção de embriões *in vitro* (PIV) se baseia essencialmente na obtenção de oócitos dos folículos

ovarianos, sua maturação *in vitro* (MIV) mediante o aporte de um microambiente e estímulos hormonais adequados, além da fecundação *in vitro* (FIV) e do cultivo (CIV) dos embriões obtidos até fases de desenvolvimento adequadas para sua transferência ou congelamento (Pfeifer et al. 2008)

Na espécie bovina, a PIV de embriões alcançou um desenvolvimento tecnológico que atualmente permite a sua aplicação em escala comercial, podendo-se obter em média cerca de 50 a 100 embriões/fêmea/ano (Varago et al. 2008). Foi observado que a inadequada maturação do oócito reduz as taxas de fecundação e de desenvolvimento embrionário, e pode ser decorrente de falhas na maturação nuclear e citoplasmática (Rizos et al. 2002, Cognie et al. 2003). Oócitos imaturos tornam-se férteis por meio do processo chamado maturação oocitária que é induzido por hormônios específicos envolvendo a ativação de vias de transdução de sinais específicas que convergem para ativar o fator promotor da maturação (MPF), o qual é a chave da atividade que catalisa a entrada na fase-M da meiose I e meiose II, (Schmitt et al. 2002, Madgwick & Jones 2007). Quando os oócitos atingem o crescimento total permanecem parados na prófase (diplóteno) da primeira meiose. As etapas da maturação meiótica nos oócitos dos vertebrados são (1) retomada da meiose I incluindo a quebra da vesícula germinativa, condensação dos cromossomos e formação do fuso, (2) transição entre meiose I e meiose II incluindo a inibição da fase-S e (3) parada na metáfase II pela atividade do fator citostático (CSF). A meiose II é completada após a fertilização do oócito maduro (Schmitt et al. 2002).

Muitas das proteínas e fatores envolvidos no reinício da meiose são sintetizadas durante as primeiras horas do cultivo *in vitro* com o MPF como responsável da retomada da meiose. O MPF é composto por duas subunidades: a ciclina B1 e a p34<sup>cdc2</sup>, sendo que o mRNA da ciclina B1 pode ser detectado em oócitos bovinos em estágio de vesícula germinativa (GV) mas a respectiva proteína ainda não está presente. O mRNA da ciclina B1 é armazenado com uma pequena cauda de poli(A) o que inativa sua tradução. O acúmulo deste transcrito leva a poliadenilação citoplasmática extensa e subsequente tradução e síntese da ciclina B, que se acumula e pode ser detectada no citoplasma do oócito três horas após o início da MIV (Levesque et al. 1996, Jones 2004, Tremblay et al. 2005).

Em oócitos bovinos tem sido observado que a

proteína ligadora de poliadenilação citoplásmica (CPEB) e a proteína Aurora-A são sintetizados e acumulados no citoplasma durante a maturação oocitária. CPEB está unido a uma sequência específica de RNA reprimindo-a. Desta forma a via de fosforilação Aurora-A-CPEB leva a poliadenilação e conseqüentemente a tradução da proteína p34<sup>cdc2</sup> unida a ciclina B1 sendo esse complexo fosforilado, o que leva a formação do chamado pré-MPF que depois de sua desfosforilação fica ativado iniciando a atividade do MPF propriamente dito (Sasayama et al. 2005).

## INFLUÊNCIA DA PI3K NA MATURAÇÃO OOCITÁRIA

A sinalização por PI3K materna pode regular a ativação do genoma embrionário (EGA) e a embriogênese pré-implantacional, mas não pode regular a fertilização e a primeira clivagem no embrião (Zheng et al. 2010). Na via de sinalização da PI3K podem-se evidenciar vários dos possíveis eventos que chegam a afetar, tanto a ativação do MPF e/ou da MAPK, quanto de proteínas como a G (Rac e Rho), que intervêm nas constantes associações e dissociações do citoesqueleto e, portanto atuam em eventos como a movimentação das mitocôndrias e grânulos corticais de igual forma que a formação e alinhamento do fuso meiótico (Chen et al. 2010).

O AMPc, originário das células foliculares, alcança o oócito por meio das junções *gap*, mantendo-se em alta concentração, via proteína quinase A (PKA). Entretanto, o decréscimo deste componente, induzido *in vivo* pelo pico pré-ovulatório de LH, induz a perda da comunicação entre as células foliculares e o oócito, diminuindo a concentração de AMPc no oócito, e inativando PKA, o que possibilita a reativação do MPF e conseqüentemente, da divisão celular (Figura 2) (Dekel 2005).

A proteína MOS, um produto do proto-oncogen c-MOS também é codificada pelo mRNA materno armazenado durante o período de maturação, sendo que esta proteína ativa a cascata da MAPK, a qual modula a atividade do MPF levando a célula a entrar no ciclo celular (transição da fase G2 para a fase M). Nos complexos oócito-células do *cumulus* (COCs) bovinos a poliadenilação dos mRNAs de proteínas que codificam para ativação de MPF e MAPK ocorre entre 9 e 12 horas do cultivo *in vitro*. A apropriada síntese e armazenamento destes transcritos no citoplasma do oócito são de crucial importância para a continuidade da retomada da



Figura 2. Esquema demonstrativo do processo de ativação do Fator Promotor da Maturação. AMPc: adenosina monofosfato cíclica; PKA: proteína quinase A; Mos: proteína do pro-oncogene c-mos; MEK: específico MAP-quinase; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; myt 1: quinase; Thr 14/Tyr 15: resíduos da subunidade cdc25; P34<sup>cdc2</sup>: proteína quinase; MPF: fator promotor de maturação e Cdc25: fosfatase de dupla especificidade (Adaptado de: Van Der Hurk & Zhao 2005).

meiose (Ferreira et al. 2009). As MAPKs (mitogen-activated kinase protein) são uma família de proteínas envolvidas na maturação do oócito. Em oócitos de mamíferos duas isoformas de MAPKs estão presentes, ERK1 e ERK2, sendo ativadas por MEK, que por sua vez, é diretamente regulada por MOS, produto do protooncogene c-mos, que é codificada pelo RNA materno e estocada durante o crescimento do oócito (Figura 2).

O momento de ativação da MAPK durante a maturação do oócito varia em diferentes espécies, mas acredita-se que a atividade da MAPK é requerida para manutenção da atividade do MPF, formação do fuso meiótico e manutenção da parada na metáfase II (Van Der Hurk & Zhao 2005).

O aumento intracelular de cálcio, induzido pela ativação do receptor inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>R) presente na membrana do retículo endoplasmático, também pode influenciar a ativação do oócito. A mobilização intracelular de cálcio é seguida por influxo de cálcio do ambiente extracelular, o qual parece ser regulado através da estimulação antagonista do LH ou da adenilato ciclase (AC) (Williams 2002, Tsafiriri & Motola 2007).

Estudos realizados em células de glândula lacrimal de ratos têm demonstrado que a ativação da MAPK é dependente de cálcio e PKC quando ativada a via de sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que inclui ativação do fator adaptador das proteínas Shc e Grb2, e a pequena G-proteína Ras. (Inagami et al. 2000, Hodges et al. 2006).

É importante ressaltar que a ativação do oócito está diretamente relacionada com a quebra da membrana nuclear, desintegração da vesícula germinati-

va, condensação da cromatina em cromossomos bivalentes e separação dos cromossomos homólogos. A retomada da meiose a partir da metáfase II ocorrerá logo após a fertilização, devido ao aumento dos níveis de cálcio, o que irá induzir a degradação da ciclina e, conseqüentemente, do MPF. Com o progresso da metáfase II ocorre a divisão desigual do citoplasma e liberação do segundo corpúsculo polar (Williams 2002, Tsafirri & Motola 2007).

### **Maturação nuclear**

A maturação nuclear refere-se à habilidade do núcleo em retomar a meiose, ou seja, chegar ao estágio de metáfase da segunda divisão meiótica, o que pode ser observado por microscopia através da extrusão do primeiro corpúsculo polar (Mermillod et al. 1996, Crozet 1997). O objetivo da maturação nuclear é a obtenção de um gameta haplóide através de dois ciclos de divisão celular meiótica. A competência meiótica inicia-se durante a formação do antro, porém o oócito permanece na prófase I até o pico de LH. A retomada da meiose é induzida *in vivo* pelo pico de LH ou quando os oócitos são isolados do ambiente folicular e colocados em meios de maturação *in vitro* (Pincus & Enzmann 1935, Bevers et al. 1997, Mehlmann 2005).

O LH atua via receptores localizados nas células da granulosa murais afetando de forma indireta a maturação do oócito. A retomada da meiose caracteriza-se pela quebra da vesícula germinativa seguida de condensação dos cromossomos e formação do fuso da metáfase I (MI). Esta primeira divisão meiótica se completa com a segregação de cromossomos homólogos entre o oócito e o primeiro corpúsculo polar, levando o oócito à metáfase II (MII) onde permanece até a fecundação (Dekel 2005).

A maturação molecular refere-se às fases de crescimento e maturação do oócito envolvendo a transcrição, armazenamento e processamento dos mRNAs expressos pelos cromossomos, que podem posteriormente ser traduzidos pelos ribossomos como proteínas. As proteínas derivadas destes mRNAs estão envolvidas na maturação e subseqüentes eventos celulares, tais como fertilização, formação de pronúcleos e embriogênese inicial (Schmitt & Nebreda 2002).

Múltiplos mecanismos estão envolvidos na ativação da tradução do mRNA inativo. Esses mecanismos envolvem a fosforilação de muitos fatores que iniciam a tradução. De acordo com esse modelo, a poliadenilação (adição de adenina) da porção ter-

minial 3' do mRNA citoplasmático pode estimular a liberação de moléculas repressoras ligadas a porção 5' iniciando assim a tradução (Thach 1992, Colgan et al. 1996, Gavin et al. 1997, Ferreira et al. 2008).

Este processo de poliadenilação inicia no núcleo, e 250 a 300 resíduos de adenina (A) são adicionados ao mRNA para a formação da cauda 3' poli(A). O transporte deste mRNA para o citoplasma ocorre por meio de uma junção característica da cauda poli(A) que, depois de atingir o compartimento citoplasmático, torna-se menor e mais heterogêneo em tamanho (Jackson et al. 1990).

O prolongamento da cauda de poli(A) no citoplasma está relacionado com a ativação da tradução, ou seja, a adição de adenina ao mRNA no citoplasma oocitário durante a maturação leva à tradução de proteínas e deadenilação, o que por sua vez leva a degradação do mRNA particular (Shim et al. 1997).

Quando comparada a qualidade dos embriões de clivagem inicial (embriões que clivaram até às 27 horas após inseminação) com embriões com baixo desenvolvimento potencial (clivagem após 27 horas) foram observadas várias diferenças nos padrões de poliadenilação do mRNA, concluindo que essas mudanças estão associadas à modulação da expressão de genes nos embriões durante esta fase. Além disso, concluiu-se também que níveis anormais de poliadenilação em alguns mRNAs maternos estão associados com menor potencial de desenvolvimento embrionário (Brevini et al. 2002).

### **Maturação citoplasmática**

A maturação citoplasmática é um processo pelo qual, diversas mudanças ultra-estruturais ocorrem em termos de morfologia e redistribuição de organelas no citoplasma do oócito (Ferreira et al. 2009). A primeira evidência da competência a maturação citoplasmática encontra-se nas alterações ultra-estruturais, onde se observa o fim da fase de preparação (síntese de RNA e proteínas), por modificações nos processos de transcrição e tradução (Fair et al. 2004).

O processo de maturação citoplasmática inclui ainda o acúmulo de moléculas específicas importantes que preparam o oócito para fecundação e subseqüente desenvolvimento embrionário (Humblot et al. 2005).

Durante essa fase de desenvolvimento, o oócito aumenta de tamanho, acompanhado do acúmulo de RNAm, proteínas, substratos e nutrientes, os quais são pré-requisitos para o oócito tornar-se competen-

te (Sirard et al. 2006). Dentre as outras mudanças, durante a fase de maturação citoplasmática, observa-se a redistribuição das organelas celulares (Ferreira et al. 2009).

Segundo Hytell et al. (1997), inicialmente as mitocôndrias ocupam regiões mais periféricas do citoplasma e a medida que a maturação acontece e alcança a metáfase II, estas organelas ocupam a posição central do oócito. Os grânulos corticais também sofrem mudanças no seu padrão de distribuição citoplasmática durante a maturação. Estes, anteriormente dispersos no citoplasma passam a ocupar a periferia do oócito (Ferreira et al. 2009). Após o pico de LH ocorre o rompimento da vesícula germinativa, o oócito se desenvolve até MII e apresenta os grânulos corticais alinhados com a membrana plasmática, as gotas de lipídios e as mitocôndrias adquirem uma posição mais central do oócito deixando uma zona periférica sem organelas. O espaço perivitelinico se desenvolve para evitar a poliespermia e o complexo de Golgi praticamente desaparece (Hytell et al. 1997)

A maturação citoplasmática não pode ser identificada somente pela organização de suas organelas, e sim em níveis moleculares (Duranthon & Renard 2001, Mermillod et al. 2008). O processo de maturação citoplasmática pode ser dividido em três principais eventos: a) redistribuição de organelas citoplasmáticas, b) movimentação de filamentos do citoesqueleto e c) maturação molecular (Maximo 2009). O tráfego de organelas durante a maturação ocorre devido à atuação de microfilamentos e microtúbulos do citoesqueleto e o reposicionamento das organelas depende das necessidades da célula durante cada estágio de desenvolvimento (Ferreira et al. 2008). Tanto para a maturação citoplasmática quanto para a formação do zigoto e o desenvolvimento embrionário inicial é de vital importância a síntese de proteínas e para este fim, uma quantidade apropriada de ribossomos deve estar presente durante a maturação. Estes são sintetizados pela transcrição de genes de RNA ribossômico (RNAr), pelo processo de transcrição e adição de proteínas ribossomais às suas subunidades. Essas subunidades são formadas nos nucléolos e durante as fases de crescimento dos oócitos e ativação do genoma embrionário ele está presente na forma fibrinogranular, refletindo a alta atividade de síntese ribossomal. (Fair et al. 2001).

A presença de ribossomos, então, é diretamente ligada à síntese protéica durante períodos cruciais

de desenvolvimento (Tomek et al. 2002). As membranas do retículo endoplasmático são fisiologicamente ativas, interagem com o citoesqueleto e contêm diferentes domínios especializados em funções diversas. Algumas dessas funções são a formação e degradação protéica, o metabolismo lipídico, a compartimentalização do núcleo, regulação do gradiente iônico de cálcio e síntese de membranas (Lippincott-Schwartz et al. 2000).

Mudanças bioquímicas e estruturais no retículo durante a maturação são críticas para um funcionamento apropriado da regulação intracelular do cálcio. Em oócitos de mamíferos o retículo é encontrado em regiões corticais e se acumula em pequenos aglomerados no citoplasma durante seu desenvolvimento até metáfase II e a liberação de cálcio é aumentada depois da maturação. Também durante a fertilização o retículo libera cálcio como resposta à entrada do espermatozóide no oócito dando início ao desenvolvimento embrionário (Stricker 2006).

Mais uma organela para ser mencionada são os grânulos corticais, os quais são derivados do complexo de Golgi e sua exocitose é um dos mecanismos para evitar a poliespermia. Estes grânulos encontram-se exclusivamente no oócito, sendo compostos por proteínas, moléculas estruturais, enzimas e glicosaminoglicanas. Para oócitos no estado de vesícula germinativa, os grânulos estão distribuídos em grupos no citoplasma. No final da maturação, quando os oócitos atingem o estágio de metáfase II, os grânulos se posicionam em contato íntimo com a membrana plasmática, como forma estratégica de bloqueio da poliespermia (Thibault et al. 1987, Ferreira et al. 2008). Todos os eventos mencionados na maturação oocitária são dependentes do metabolismo energético da célula, em particular da resposta metabólica à insulina mediada primariamente pela enzima PI3K e posteriormente pela GSK3, que regula tanto a síntese de glicogênio, quanto a de proteínas. A insulina, assim como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), promove o desenvolvimento embrionário. O receptor para IGF-I é expresso a partir do estágio de mórula (Salute et al. 1992, Herler et al. 1998).

Quando as células entram em mitose o crescimento dos microtúbulos a partir dos centrossomos se incrementa drasticamente. Estas alterações na dinâmica dos microtúbulos ocorrem concomitantemente com a fosforilação de muitas proteínas, por meio da ativação de uma série de quinases mitóticas, tais como cdc2 quinase, pólo quinase e aurora

quinase (Wakefield et al. 2003). Os filamentos do citoesqueleto são estruturas dinâmicas e adaptáveis que podem mudar ou permanecer imóveis segundo a necessidade da célula. Além disso, este sistema é responsável pela segregação dos cromossomos durante a mitose e meiose, pela divisão celular durante a citocinese e pelo tráfego de moléculas e organelas dentro da célula (Alberts et al. 2004).

Os três tipos de filamento do citoesqueleto são os microtúbulos, filamentos de actina e filamentos intermediários. Sua função principal é a resistência mecânica em resposta ao estresse. Esses três tipos de “polímeros” do citoesqueleto estão unidos por simples interações não covalentes o que permite associar-se ou dissociar-se rapidamente sem a necessidade de uma nova formação ou ruptura de uniões covalentes (Alberts et al. 2004).

Dentre os três tipos de filamentos os microtúbulos são os mais diretamente envolvidos no processo de movimentação das organelas (Sun et al. 2006). As subunidades do microtúbulo se aderem com proteínas motoras como a dineína, dinactina e kinesina as quais se ligam a moléculas das membranas das organelas promovendo o movimento ao longo dos microtúbulos (Steffen et al. 1997). A dinâmica dos filamentos do citoesqueleto está relacionada com a aquisição das competências de desenvolvimento nuclear em oócitos de bovinos e suínos (Albarracín et al. 2005). Outro dos componentes do citoesqueleto são os microfilamentos os quais são mediadores da migração periférica do aparelho meiótico (cromossomos), movimento excêntrico dos grânulos corticais, ancoragem do fuso e determinante nas mensagens do córtex, estabelecimento da polaridade, e emissão do primeiro corpo polar durante a maturação do oócito. Os microfilamentos estão também envolvidos na incorporação do espermatozóide, rotação do fuso (em camundongo), exocitose dos grânulos corticais e emissão do segundo corpo polar durante a fertilização (Sun et al. 2006).

As proteínas que unem nucleotídeos de guanina, também denominadas proteínas G, possuem um papel importante na transdução de sinais, porque acoplam um receptor ativado com uma proteína efetora. São capazes de modular enzimas como a adenilato ciclase e a fosfolipase C, canais iônicos, assim como a expressão de genes, o transporte intravesicular e o rearranjo do citoesqueleto de actina (Garcia-Soto et al. 2004). Em eucariotos existem mais de 100 proteínas G monoméricas, desde leveduras até o homem e se agrupam na superfamília

Ras. Esta compreende as famílias Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf e Ran com suas correspondentes subfamílias (Garcia-Soto et al. 2004). Qian et al. (2004) identificaram o mecanismo molecular da PI3K na remodelação dos filamentos de actina e a migração celular em fibroblastos de embrião de frango (CEF). Este mecanismo mostra como p70S6K1 (proteína quinase da sub unidade ribossomal S6) é uma molécula capaz de mediar os efeitos da PI3K e da AKT sobre os filamentos de actina, mas para sua atividade é necessária a proteína Rac. A utilização do inibidor da enzima PI3K, Wortmannin, aumentou a taxa de blastocistos obtidos pela técnica de produção *in vitro* de embriões bovinos, quando usado em concentrações nanomolares durante a etapa de maturação dos COC's (complexos oócito células do cumulus) (Fernandes 2010), mas não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de glicose e glicogênio presentes nos oócitos, indicando que o metabolismo energético não é o alvo principal da via da PI3K durante a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albarracín J., Morató R., Izquierdo D. & Mogas T. Effects of ooscovicine on the nuclear and citoesqueletal components of calf oocytes and subsequent development. *Theriogenology*, 64:1740-1755, 2005.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. 4ª ed. Artmed, Porto Alegre, 2004. 1463p.
- Bever M., Dieleman S., Van Den Hurk R. & Izadiar F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*, 47:13 e 22, 1997.
- Brevini T.A., Lonergan P., Cillo F., Francisci C., Favetta L.A., Fair T. & Gandolfi F. Evolution of mRNA polyadenylation between oocyte maturation and first embryonic cleavage in cattle and its relation with developmental competence. *Mol. Reprod. Develop.*, 63:510-517, 2002.
- Brunet A., Datta S.R. & Greenberg M.E. Transcription-dependent and independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 11:297-305, 2001.
- Chen K., Obinata H. & Izumi T. Detection of G protein-coupled receptor-mediated cellular response involved in cytoskeletal rearrangement using surface plasmon resonance. *Biosen. Bioelect.*, 25:1675-1680, 2010.
- Cognié Y., Baril G., Poulin N. & Mermillod P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, 59:171-188, 2003.
- Colgan D., Murthy K., Prives C. & Manley J. Cell-cycle related regulation of poly(A) polymerase by phosphorylation. *Nature*, 384:282-285, 1996.
- Crozet N. *In vitro* generation of one cell embryos in sheep and goat. Transgenic animals: generation and use. Hardwood Academic Publishers, Amsterdam, 1997. 576p.

- Dekel N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 234:19-25, 2005.
- Dudek H., Datta S.R., Franke T.F., Birnbaum M.J., Yao R., Cooper G.M., Segal R.A., Kaplan D.R. & Greenberg M.E. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*, 275:661-665, 1997.
- Duranthon V. & Renard J.P. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology*, 55:1277-1289, 2001.
- Fair T., Hyttel P., Lonergan P. & Boland M.P. Immunolocalization of nucleolar proteins during bovine oocyte growth, meiotic maturation and fertilization. *Biol. Reprod.*, 64:1516-1525, 2001.
- Fair T., Murphy M., Rizos D., Moss C., Martin F., Boland M. & Lonergan P. Analysis of differential maternal mRNA expression in developmentally competent and incompetent bovine two-cell embryos. *Mol. Reprod. Develop.*, 67:136-144, 2004.
- Fernandes H.G. *Influência da via de sinalização por insulina na maturação e desenvolvimento embrionário inicial em bovinos*. Tese (Ciência Animal), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2010.
- Ferreira E., Vireque A., Adona P., Meirelles F., Ferriani R. & Navarro P. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 71:836-848, 2009.
- Ferreira E., Vireque A., Adona P., Meirelles F., Ferriani R. & Navarro P. Maturação citoplasmática de oócitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 32:172-181, 2008.
- Franke T.F., Hornik C.P., Segev L., Shostak G.A. & Sugimoto C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene*, 22:8983-8998, 2003.
- Fulka J., First N. & Moor R. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol. Human Reprod.*, 4:41-49, 1998.
- García-Soto J., Martínez G., Covian F., Manzo S. & Lopez J. Función de las proteínas que unen nucleótidos de guanina en La fecundación. *Rev. Cienc. Frontera*, 3:11-16, 2004.
- Gavin A. & Schorderet-Slatkine S. Ribosomal S6 kinase p90rsk and mRNA cap-binding protein eIF4E phosphorylations correlate with MAP kinase activation during meiotic reinitiation of mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 46:383-391, 1997.
- Herler A., Krusche C. & Beier H. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biol. Reprod.*, 59:1302-1310, 1998.
- Hodges R., Rios J., Vrouvlianis J., Ota I., Zoukhri D. & Dartt D. Roles of Protein Kinase C, Ca<sup>2+</sup>, Pyk2 and c-Src in Agonist Activation of Rat Lacrimal Gland p42/p44 MAPK. *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.*, 47:3352-3359, 2006.
- Huang E.J. & Reichardt L.F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Ann. Rev. Neurosci.*, 24:677-736, 2001.
- Humbolt P., Holm P., Lonergan P., Wrenzycki C., Lequarre A.S., Joly C.G., Herrmann D., Lopes A., Rizos D., Niemann H. & Callesen H. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, 63:1149-1166, 2005.
- Hyttel P., Fair T., Callesen H. & Grve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47:23-32, 1997.
- Inagami T. & Eguchi S. Angiotensin II-mediated vascular smooth muscle cell growth signaling. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 33:619-624, 2000.
- Jagarlamudi K., Liu L., Adhikari D., Reddy P., Idahl A., Ottander U., Lundin E. & Liu K. Oocyte-specific deletion of Pten in mice reveals a stage-specific function of PTEN/PI3K signaling in oocytes in controlling follicular activation. *PLoS One*, 4:6186, 2009.
- Jackson I., Chambers D., Rinchik E. & Bennett D. Characterization of TRP-1 mRNA Levels in Dominant and Recessive Mutations at the Mouse brown (b) Locus. *Genetics*, 126:451-459, 1990.
- Jones K. Turn it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Mol. Hum. Reprod.*, 10:1-5, 2004.
- Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.*, 351:289-305, 2000.
- Kumar A., Redondo-Muñoz J., Perez-Garcia V., Cortes I., Chagoyen M. & Carrera A. Nuclear but not cytosolic phosphoinositide 3-kinase beta has an essential function in cell survival. *Mol. Cell. Biol.*, 31:2122-2133, 2011.
- Leevers S., Vanhaesebroeck B. & Waterfield M.D. Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 11:219-225, 1999.
- Levesque J. & Sirard M. Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 55:1427-1436, 1996.
- Lippincott-Schwartz J., Roberts T.H. & Hirschberg K. Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 16:557-589, 2000.
- Maximo D. *Características ultraestruturais de oócitos ovinos durante a maturação in vitro*. Dissertação (Ciências Veterinárias) de mestrado. Universidade de Brasília. 2009.
- Mehlmann L. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, 130:791-799, 2005.
- Mermillod P., Lonergan P., Carolan C., Khatir H., Poulin N. & Cognié Y. Maturation ovocytaire *in vitro* chez les ruminants domestiques. *Contracep. Fertil. Sex.*, 24:552-558, 1996.
- Mermillod P., Dalbiès-Tran R., Uzbekova S., Thélie A., Traverso J.M., Perreau C., Papillier P. & Monget P. Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle? *Reprod. Domest. Anim.*, 43(supl. 2):393-400, 2008.
- Park M., Gupta M., Lee H., Das Z., Uhm S. & Lee H. Possible involvement of class III phosphatidylinositol-3-kinase in meiotic progression of porcine oocytes beyond germinal vesicle stage. *Theriogenology*, 75:940-950, 2011.
- Pfeifer L., Schneider A. & Correa M. Factors that affect the *in vitro* production of bovine embryos: A review. *Rev. Col. Cienc. Pec.*, 21:109-120, 2008.
- Pincus G. & Enzmann V. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Med.*, 62:665-675, 1935.



- Pradeep R., Wenjing Z. & Liu K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends Endocrinol. Metabol.*, 21:96-103, 2009.
- Qian Y., Corum L., Meng Q., Blenis J., Zheng J.Z., Shi X., Flynn D.C. & Jiang B. PI3K induced actin filament remodeling through Akt and p70S6K1: implication of essential role in cell migration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 286: C153-C163, 2004.
- Rizos D., Ward F., Duffy P., Boland M. & Lonergan P. Consequence of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Develop.*, 61:234-248, 2002.
- Salute M. & Tucker K. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) in yolk sac fluid, uterine flush and conceptus conditioned media during early pregnancy in mares. *Biol. Reprod.*, 46:46-68, 1992.
- Sasayama T., Marumoto T., Kunitoku N., Zhang D., Tamaki N., Kohmura E., Saya H. & Hirota T. Over-expression of Aurora-A targets cytoplasmic polyadenylation element binding protein and promotes mRNA polyadenylation of *dk1* and cyclin B1. *Genes Cells*, 10:627-638, 2005.
- Schaeffer H.J. & Weber M.J. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell Biol.*, 19:2435-2444, 1999.
- Scheid M.P., Marignani P.A. & Woodgett J.R. Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol. Cell Biol.*, 22: 6247-6260, 2002.
- Schmitt A. & Nebreda A.R. Signalling pathways in oocytes meiotic maturation. *J. Cell Sci.*, 115: 2457-2459, 2002.
- Shim C., Lee S.G., Song W.K., Lee C.S., Lee K.K. & Kim K. Laminin chain-specific gene expression during mouse oocyte maturation. *Mol. Reprod. Develop.*, 48:185-193, 1997.
- Sirard M., Richard F., Blondin P. & Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65:126-136, 2006.
- Steffen W., Karki S., Vaughan K.T., Vallee R.B., Holzbaur E.L., Weiss D.G. & Kuznetsov S.A. The involvement of the intermediate chain of cytoplasmic dynein in binding the motor complex to membranous organelles of *Xenopus* oocytes. *Mol. Cell Biol.*, 8:2077-2088, 1997.
- Stricker S. Structural reorganization of the endoplasmic reticulum during maturation and fertilization. *Sem. Cell Development. Biol.*, 17:303-313, 2006.
- Szollosi D. Oocyte maturation, p.307-325. In: Thibault C., Levasseur C. & Hunter R.H.F. (Eds), *Reproduction in mammals and man*. Ellipses, Paris, 1993.
- Thach R.E. The involvement of eIF-4E in regulating gene expression. *Cell*, 68:177-180, 1992.
- Thibault C., Szollosi D. & Gérard M. Mammalian oocyte maturation. *Reprod. Nutr. Develop.*, 27:885-896, 1987.
- 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. Domestic Anim.*, 37:86-91, 2002.
- Tremblay K., Vigneault C., Mcgraw S. & Sirard M. Expression of cyclin B1 messenger RNA isoforms and initiation of cytoplasmic polyadenylation in the bovine oocyte. *Biol. Reprod.*, 72:1037-1044, 2005.
- Tsafiri A. & Motola S. Are steroids dispensable for meiotic resumption in mammals? *Endocrinol. Metabol.*, 18: 321-327, 2007.
- Van der Hurk R. & Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63:1717-1751, 2005.
- Varago F., Mendonça L. & Lagares M. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectivas de uma técnica em constante evolução. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 32:100-109, 2008.
- Vivanco I. & Sawyers C.L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2:489-501, 2002.
- Wagner E. & Nebreda A. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat. Rev. Cancer*, 9:537-549, 2009.
- Wakefield J., Stephens D. & Tavaré J. A role for glycogen synthase kinase-3 in mitotic spindle dynamics and chromosome alignment. *J. Cell Sci.*, 116:637-646, 2003.
- Wilhelm S.M., Carter C., Tang L., Wilkie D., McNabola A., Rong H., Chen C., Zhang X., Vincent P., McHugh M., Cao Y., Shujath J., Gawlak S., Eveleigh D., Rowley B., Liu L., Adnane L., Lynch M., Auclair D., Taylor I., Gedrich R., Voznesensky A., Riedl B., Post L.E., Bollag G. & Trail P.A. Bay 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.*, 64:7099-7109, 2004.
- Williams C.J. Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Human Reprod. Update*, 8:313-321, 2002.
- Zheng W. & Liu K. The emerging role of maternal phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) signaling in manipulating mammalian preimplantation embryogenesis. *Cell Cycle*, 10:178-179, 2011.
- Zheng W., Gorre N., Shen Y., Noda T., Ogawa W., Lundin E. & Liu K. Maternal phosphatidylinositol 3-kinase signaling is crucial for embryonic genome activation and preimplantation embryogenesis. *EMBO Rep.*, 11(11), 2010.
- Zhou H., Summers S.A., Birnbaum M.J.Y. & Pittman R.N. Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 273:16568-16575, 1998.
- Zhou X., Takatoh J. & Wang F. The mammalian class 3 PI3K (PIK3C3) is required for early embryogenesis and cell proliferation. *PLoS One*, 6:16358, 2011.