

## REGULAÇÃO DA MATURAÇÃO E EXPANSÃO DO *CUMULUS* PELAS PROTEÍNAS QUINASE A E C EM OÓCITOS BOVINOS<sup>1</sup>

### REGULATION OF OOCYTE NUCLEAR MATURATION AND *CUMULUS* EXPANSION BY PROTEIN KINASE A AND C IN THE BOVINE

Autor: Alvaro Gonzalo Hernández Vignola<sup>2</sup>

Comissão Examinadora: Paulo Bayard Dias Gonçalves<sup>3</sup>

Assis Roberto de Bem<sup>4</sup>

José Ricardo de Figueiredo<sup>5</sup>

O presente trabalho foi delineado com o objetivo de avaliar os efeitos da estimulação da proteína quinase C (PK-C) e sua interação com a proteína quinase A (PK-A) no reinício da meiose, maturação nuclear e expansão do *cumulus* em oócitos bovinos. Também foi investigada a ação da PK-C na maturação citoplasmática e desenvolvimento embrionário. Em um pré-experimento, oócitos nos estágios de vesícula germinativa (VG), metáfase I (MI) e metáfase II (MII) foram fixados em ácido acético:metanol (1:3) em lâminas (FLL), ou em placa de petri (FPL) e corados com lacmoide a 1% em PBS (phosphate buffered saline). Em um terceiro grupo foram fixados em lâmina e corados com Giemsa (FLG). A seguir, os oócitos foram examinados em microscópio equipado com contraste de fase. Nos experimentos com segundos mensageiros, os oócitos foram aspirados com bomba de vácuo de folículos com diâmetros entre 2 e 8mm, de ovários obtidos em matadouro. Foram

cultivados em TCM modificado com 25mM de Hepes, 2,2 mg/ml de bicarbonato de sódio e 3mg/ml de albumina sérica bovina (BSA) a 30°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Foram realizados os seguintes experimentos: 1. os oócitos foram estimulados por diferentes segundos mensageiros durante 7 ou 18h. Após este período de estimulação, os estágios de maturação nuclear, às 7 ou 18h, e o grau de expansão do *cumulus*, às 18h, foram avaliados. 2. os oócitos foram estimulados na presença de soro fetal bovino e foram investigadas as ações das PK-C e PK-A na regulação da maturação nuclear. 3. oócitos foram cultivados por 24h na presença de soro de vaca em estro acrescido de LH (1,5µg/ml), FSH e LH (0,5µg/ml e 1,5µg/ml) ou forbol éster promotor de tumores 12-O-tetradecanoil-13-acetate (PMA, estimulador da PK-C; 100nM), e foram avaliadas a clivagem e o desenvolvimento embrionário. No pré-experimento, o estágio de vesícula germinativa foi observado

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97119-900, Santa Maria, RS em 05.12.95. Trabalho financiado pela FAPERGS.

<sup>2</sup>Médico Veterinário, aluno do Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, UFSM. Bolsista do CNPq.

<sup>3</sup>Professor Adjunto, Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM.

<sup>4</sup>Pesquisador do CENARGEN/EMBRAPA, Brasília, DF.

<sup>5</sup>Professor Visitante, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE.



corretamente somente com a técnica de FLL. Entretanto, as técnicas de FPL e FLG foram as mais eficientes para os oócitos em MI e MII. O PMA e 1,2-dioctanoyl-sn-glycerol (DiC8) estimularam o reinício da meiose e a maturação nuclear em uma forma dependente da concentração (0-100nM respectivamente). O tratamento com forskolin (FK) inibiu transitariamente o reinício da meiose e diminuiu a porcentagem de oócitos que maturaram, enquanto a ativação da PK-C pelo PMA superou esse efeito inibitório. O FK estimulou a expansão do *cumulus* inclusive em presença de PMA; entretanto, o PMA teve uma mínima resposta na expansão do *cumulus*. A adição de soro fetal bovino ao meio não teve influência nos efeitos do FK e PMA. Não houve diferenças significativas nas taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário nos grupos maturados com ou sem hormônios ou PMA. Os resultados demonstraram que a PK-C está envolvida na regulação nuclear em oócitos bovinos, estimulando o reinício da meiose e a maturação nuclear, e interage com a PK-A, bloqueando a sua ação inibitória. De uma outra maneira, a PK-C e a PK-A estão também envolvidas na regulação da mucificação das células do *cumulus*.

**Palavras-chave:** segundos mensageiros, proteína quinase-A, proteína quinase-C, oócito, bovinos.

The present study was conducted to determine the effect of protein kinase-C (PK-C) and the possible interaction with the protein kinase-A (PK-A) in the resumption of meiosis, nuclear maturation and *cumulus* expansion in bovine oocytes. Also, the effect of PK-C stimulation in cytoplasmic maturation and embryo development was investigated. In a pre-experiment, oocytes in germinal vesicle (GV), metaphase I (MI) and metaphase II (MII) stages were fixed in acetic acid: methanol (1:3) either on slides (FLL) or in petri dishes (FPL) and stained with 1% of lacmoid in phosphate buffered saline (PBS). Also, the oocytes were fixed on slides immersed in acetic acid: methanol (1:3) and stained with Giemsa (FLG). In the experiments that studies the role of second messengers

on oocyte maturation, the oocytes were aspirated using a vacuum pump from 2-8mm follicles, from ovaries obtained in a slaughterhouse, and were cultured in modified TCM 199 medium containing 25mM hepes, 2.2mg/ml sodium bicarbonate and 3mg/ml bovine serum albumin (BSA) at 39°C under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air and saturated humidity. The following experiments were accomplished: 1) the oocytes were stimulated by different second messengers during 7 or 18h to evaluate nuclear maturation (at 7h and 18h) and *cumulus* expansion (at 18h); 2) oocytes were stimulated in the presence of fetal bovine serum, and the effects of PK-A and PK-C in the regulation of nuclear maturation were investigated; 3) oocytes were cultured during a period of 24h in the presence of estrous cow serum supplemented with LH (1.5µg/ml), FSH and LH (0.5µg/ml and 1.5µg/ml) or PMA (active phorbol ester, stimulator of PK-C; 100nM), for investigating cleavage and embryo development rates. In the pre-experiment, the GV stage was accurately identified only with the FLL technique. However, FPL and FLG procedures were more efficient for oocytes in the MI and MII stages. PMA and 1,2-dioctanoyl-sn-glycerol (DiC8) stimulated meiotic resumption and nuclear maturation in a dose dependent manner (0-100nM and 0-10mM, respectively). The treatment with forskolin (FK) significantly inhibits resumption of meiosis and decreases the percentage of oocytes in the MII stage, but PK-C stimulation reversed this inhibitory effect. Forkolin stimulated *cumulus* expansion in the presence and absence of PMA; however, PMA had only a slight effect in *cumulus* expansion. There were no significant differences in cleavage and embryo development among treatment groups. The results suggest that PK-C is involved in the regulation of oocyte maturation in the bovine, stimulating both the resumption of meiosis and nuclear maturation. Also, PK-C suppresses the inhibitory effect of PK-A on oocyte nuclear maturation. In regarding to *cumulus* expansion, PK-C and PK-A are involved in the regulation of *cumulus* cells mucification.

**Key words:** second messengers, protein kinase-A, protein kinase-C, oocyte, bovine.