

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

MAYARA OLIVEIRA

KISSPEPTINA: Efeito na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos

Uberlândia

2016

MAYARA OLIVEIRA

KISSPEPTINA: Efeito na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Mestrado, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva.

Orientador(a): Ricarda Maria dos Santos
Coorientador(a): Gustavo Guerino Macedo

Uberlândia

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- O48k Oliveira, Mayara, 1990
2016 Kisspeptina: efeito na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos /
Mayara Oliveira. - 2016.
52 p. : il.
- Orientadora: Ricarda Maria dos Santos.
Coorientador: Gustavo Guerino Macedo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.
1. Veterinária - Teses. 2. Hormônios - Teses. 3. Bovino -
Melhoramento genético - Teses. 4. Fertilização *in vitro* - Teses. I. Santos,
Ricarda Maria dos. II. Macedo, Gustavo Guerino. III. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias. IV. Título.

*A João Ferreira de Oliveira (em memória), por todos os
aprendizados e, em particular por me ensinar “o que é certo e o
que é errado”. Ao meu marido, Marcos por todo amor,
compreensão e apoio.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por permitir a realização deste trabalho e por me proporcionar vida, amigos e família.

À minha família pelo amor incondicional, carinho e apoio ao longo dessa jornada.

À minha orientadora Professora Ricarda Maria dos Santos, pelo apoio e aprendizagem que me proporcionou durante o mestrado, sendo um exemplo de pessoa e referência, a qual tive o prazer de conhecer durante a minha graduação.

Ao meu coorientador Professor Gustavo Guerino Macedo pela confiança depositada, aprendizado e apoio no desenvolvimento desse projeto.

Aos Professores Emilio e Kele que me ajudaram na execução desse projeto, fornecendo conhecimentos de grande valor diante dos problemas.

À minha amiga doutoranda Carla que se dispôs a me ouvir e apoiar em momentos difíceis.

Aos amigos do laboratório de Reprodução Animal que me ajudaram durante todo o experimento. Em especial à Deize que se tornou uma amiga em tão pouco tempo e me proporcionou muitos conhecimentos acerca da PIV, ao Jairo pela paciência de lidar apenas com mulheres e por ajudar de forma incondicional ao longo do trabalho, a Mayara, Luciana e Barbara por estarem presentes durante os procedimentos e foram de total importância na execução dos mesmos. À Renata e a Sara pelo incentivo e amizade que me ofereceram durante os duros momentos do mestrado.

À Dona Maria pela organização, amizade e pelos cafezinhos que me manteve sempre desperta.

Ao Frigorífico Real por disponibilizar os ovários para a pesquisa.

Aos integrantes da banca que dispuseram de tempo para a avaliação deste trabalho.

"Aquele que cede ante ao obstáculo, que desiste diante da dificuldade já perdeu a batalha sem a ter enfrentado. Não raro, o obstáculo e a dificuldade são mais aparentes que reais, mais ameaçadores do que impeditivos. Só se pode avaliar após o enfrentamento. Ademais, cada vitória conseguida se torna aprimoramento da forma de vencer e cada derrota ensina a maneira como não se deve tentar a luta. Essa conquista é proporcionada mediante o esforço de prosseguir sem desfalecimento e insistir após cada pequeno ou grande insucesso. O objetivo deve ser conquistado, e, para tanto, a coragem do esforço contínuo é indispensável. Muitas vezes será necessário parar para refletir, recuar para renovar forças e avançar sempre. É uma salutar estratégia aquela que faculta perder agora o que é de pequena monta para ganhar resultados permanentes e de valor expressivo depois."

Joanna de Ângelis/Divaldo P. Franco

RESUMO

Objetivou-se avaliar diferentes concentrações de kisspeptina, assim como a interação da kisspeptina e FSH/LH na MIV e competência ovocitária de bovinos. No experimento 1 foi determinada a concentração mínima de Kisspeptina (Kp) a ser utilizada, e no Experimento 2 foi avaliada sua interação com FSH e LH. Foram coletados ovários bovinos em abatedouro comercial e apenas ovócitos Grau I foram utilizados. Os ovócitos foram cultivados em meio TCM-199 com Bicarbonato, acrescido de 10% de SFB, piruvato de sódio (22 μ g/mL), amicacina (83mg/mL), FSH (0,5 μ g/mL) com diferentes concentrações de Kp, sendo: FSH + 0M Kp-10; FSH + 10 $^{-7}$ M Kp-10; FSH + 10 $^{-6}$ M Kp-10; FSH + 10 $^{-5}$ M Kp-10. No Experimento 2, foi utilizada a melhor concentração de Kp encontrada no Experimento 1, nos seguintes tratamentos: sem hormônios; FSH; FSH + Kp-10; FSH + LH; FSH, LH + Kp-10; Kp-10. A competência ovocitária foi determinada pela maturação nuclear, distribuição mitocondrial, intensidade de fluorescência de MitoTracker® Orange CMTMRos e DCF. A avaliação da maturação nuclear foi realizada após as 24hs de incubação e os ovócitos foram corados com DAPI para determinar o estágio nuclear (Vesícula Germinativa-VG, MetáfaseI-MI e MetáfaseII-MII). A distribuição mitocondrial foi classificada em periférica/semiperiférica e difusa em aglomerados/grânulos, foi avaliada após a coloração com o MitoTracker® Orange CMTMRos e também foi identificado a intensidade da mesma. Para determinar a intensidade de ROS os ovócitos foram corados com DCF. As análises foram realizadas pelo PROC GLIMMIX do SAS. No Experimento 1 ovócitos em meio com apenas FSH atingiram uma menor maturação nuclear quando comparados àqueles maturados com a Kp em diferentes concentrações (FSH:13/33; FSH + 10 $^{-7}$ M Kp-10: 28/35; FSH + 10 $^{-6}$ M Kp-10:30/34; FSH + 10 $^{-5}$ M Kp-10:28/32; P=0,0001). Não houve diferença estatística na distribuição mitocondrial entre os tratamentos (P>0,05). A intensidade de fluorescência do MitoTracker não variou entre os tratamentos (P>0,05). A intensidade de fluorescência do DCF foi menor, quanto maior a concentração de Kp no meio (FSH:12177726,1; FSH + 10 $^{-7}$ M Kp-10:10945982,83; FSH + 10 $^{-6}$ M Kp-10:9820536,53; FSH + 10 $^{-5}$ M Kp-10:9147016,38; P<0,0001). Baseado nos resultados do Experimento 1, a concentração de Kp foi determinada em 10 $^{-7}$ M. No Experimento 2 a distribuição mitocondrial foi diferente entre os tratamentos, pois ovócitos maturados apenas com Kp ou FSH+LH, atingiram uma maior competência ovocitária do que aqueles que foram maturados apenas com FSH ou sem a adição dos hormônios (sem hormônio:66,66%; FSH:66,66%; FSH + Kp-10:75,86%; FSH + LH:91,17%; FSH, LH + Kp-10:82,85%; Kp-10:91,17%; P<0,05). O sem hormônio resultou em uma menor maturação nuclear do que os demais tratamentos (sem hormônio: 5/18; FSH:18/32; FSH + Kp-10:22/29; FSH + LH:26/33; FSH, LH + Kp-10:26/34; Kp-10:25/34; P=0,0094). A intensidade de fluorescência das probes MitoTracker e DCF foi menor quando a Kp foi adicionada ao meio de maturação (sem hormônio:1228363/540069; FSH:2307984/1395751; FSH + Kp-10:1941890/1114948; FSH + LH:2502145/1722376; FSH, LH + Kp-10:2286173/1467782; Kp-10:1859411/979325 P<0,0001). Assim, esse é o primeiro trabalho que evidencia que a Kisspeptina estimula a maturação ovocitária sem a presença de gonadotrofinas no meio de maturação.

Palavras chave: Kisspetina. Competência ovocitária. Vacas. Ovócitos.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate different concentrations of kisspeptin, as well as the interaction of kisspeptin and FSH/LH in vitro maturation and oocyte competence in cattle. In Experiment 1 was determined the minimum concentration of Kisspeptin (Kp) to be used, and in Experiment 2 was evaluated its interaction with FSH and LH. The oocytes were collected in a commercial slaughterhouse and only Grade I oocytes were utilized. The oocytes were cultured in TCM-199 medium with bicarbonate plus 10% FBS, sodium pyruvate (22 μ g/mL), amikacin (83mg/mL), FSH (0.5 μ g/mL), with different concentrations of Kp, the treatments were: FSH + 0M Kp-10; FSH + 10⁻⁷M Kp-10, FSH + 10⁻⁶M Kp-10; FSH + 10⁻⁵M Kp-10. In Experiment 2, was used better concentration of Kp found in Experiment 1, the following treatments: no hormones; FSH; FSH + Kp-10; FSH + LH; FSH, LH + Kp-10; Kp-10. The oocyte competence was determined by nuclear maturation, mitochondrial distribution, MitoTracker® Orange CMTMRos fluorescence intensity and DCF. The evaluation of nuclear maturation was made after 24 hours incubation and the oocytes were stained with DAPI to determine the nuclear stage (Germinal Vesicle-GV, Metaphase I-MI and Metaphase II-MII). The mitochondrial distribution was classified as peripheral/semiperipheral and diffuse in clusters/granules, evaluated after stained with the MitoTracker® Orange CMTMRos, and was also identified the intensity of it. To determine the intensity of ROS oocytes were stained with DCF. The statistical analysis was performed by SAS GLIMMIX PROC. In Experiment 1 oocytes matured only with the FSH reached a smaller nuclear maturation when compared to those who were matured with Kisspeptin at different concentrations (FSH:13/33; FSH + 10⁻⁷M Kp-10: 28/35; FSH + 10⁻⁶M Kp-10:30/34; FSH + 10⁻⁵M Kp-10:28/32; P=0,0001). There was no statistical difference in mitochondrial distribution between treatments (P>0.05). The fluorescence intensity of MitoTracker did not differ among treatments (P>0.05). The DCF fluorescence intensity was lower when the concentration of Kp was increased in the medium (FSH:12177726,1; FSH + 10⁻⁷M Kp-10:10945982,83; FSH + 10⁻⁶M Kp-10:9820536,53; FSH + 10⁻⁵M Kp-10:9147016,38; P<0,0001). Based in the Experiment 1 results, the concentration of Kp was determined in 10⁻⁷M. In Experiment 2 the mitochondrial distribution was different between treatments, because oocytes matured only with Kp or FSH+LH, reached a oocyte competence greater than those matured with FSH only or without hormone addition (no hormones:66,66%; FSH:66,66%; FSH + Kp-10:75,86%; FSH + LH:91,17%; FSH, LH + Kp-10:82,85%; Kp-10:91,17%; P<0,05). The no hormones resulted in a lower nuclear maturation than the other treatments (no hormones: 5/18; FSH:18/32; FSH + Kp-10:22/29; FSH + LH:26/33; FSH, LH + Kp-10:26/34; Kp-10:25/34; P=0,0094). The fluorescence intensity of probes MitoTracker and DCF was lower when Kp was added to the maturation medium (no hormones:1228363/540069; FSH:2307984/1395751; FSH + Kp-10:1941890/1114948; FSH + LH:2502145/1722376; FSH, LH + Kp-10:2286173/1467782; Kp-10:1859411/979325 P<0,0001). So this is the first study that shows that Kisspeptin stimulates oocyte maturation without the presence of gonadotropins in the maturation medium.

Keywords: Kisspeptin. oocyte competence. Cows. Oocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estágios de maturação nuclear dos ovócitos.....	32
Figura 2 - Distribuição mitocondrial de ovócitos corados com MitoTracker® Orange CMTMRos e ROS com DCF.....	34
Figura 3 - Intensidade de fluorescência do Mitotracker CMTMRos Orange e de DCF de ovócitos bovinos maturados in vitro, em diferentes concentrações de Kisspeptina.....	34
Figura 4 - Intensidade de fluorescência do Mitotracker CMTMRos Orange e de DCF de ovócitos bovinos maturados in vitro, em diferentes meios de maturação.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Desenho Experimental.....	29
Tabela 2 – Distribuição mitocondrial e maturação nuclear de ovócitos bovinos maturados <i>in vitro</i> , em diferentes concentrações de Kisspeptina-10.....	32
Tabela 3 – Distribuição mitocondrial e maturação nuclear de ovócitos bovinos maturados <i>in vitro</i> , em diferentes meios de maturação.....	35

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Ovogênese	14
2.2 Foliculogênese	14
2.3 Competência Ovocitária.....	16
2.3.1 Maturação nuclear.....	17
2.3.2 Maturação Citoplasmática.....	18
2.3.3 Maturação molecular.....	20
2.4 Kisspeptina	21
2.4.1 Sinalização da Kisspeptina via Kiss1R.....	22
2.4.2 Ação da Kisspeptina na hipófise e hipotálamo	23
2.4.3 Kisspeptina e sua ação no trato reprodutivo.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Reagentes.....	28
3.2 Obtenção e seleção dos complexos címulos ovócitos	28
3.3 Delineamento experimental.....	29
3.4 Coloração dos ovócitos.....	30
3.5 Avaliação da competência ovocitária	30
3.6 Análise estatística.....	31
4. RESULTADOS.....	32
5. DISCUSSÃO.....	36
6. CONCLUSÃO.....	39
REFERENCIAS	40
ANEXOS	51
Anexo A: Meios utilizados na Maturação <i>in vitro</i> de ovócitos bovinos.....	51

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é utilizada como alternativa para potencializar a produção e melhoramento genético do rebanho de alto valor zootécnico. Contudo, o potencial da biotécnica fica aquém do esperado, já que existe uma compreensão limitada a respeito das condições necessárias para o desenvolvimento dos ovócitos *in vitro*.

A PIV envolve três etapas consecutivas: a maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos, fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) de embriões. A MIV é uma das fases mais críticas do processo, pois envolve a capacidade do ovócito em completar a meiose, bem como alterações bioquímicas, estruturais e citoesqueléticas que serão importantes para a fecundação e desenvolvimento embrionário subsequente (DODE et al., 2000; BERTAGNOLLI et al., 2004; DADARWAL et al., 2015). O processo de maturação ovocitária inclui alterações nucleares e citoplasmática, que são eventos distintos, porém interligados. Os ovócitos com uma maturação nuclear completa, em tempo regular, mas que não possuam alterações citoplasmáticas, não serão fecundados ou não conseguem sustentar o desenvolvimento embrionário (MEIRELLES et al., 2004).

Na tentativa de alcançar melhores índices de maturação ovocitária em bovinos, pesquisadores vêm desenvolvendo meios que melhor mimetizam o que ocorre *in vivo*, na vaca (GUEMRA et al.; 2013; SILVA; CALEGARI; MARTINS JUNIOR, 2009; COELHO et al., 1998). Assim, o uso da kisspeptina nos meios de maturação pode ser uma alternativa para atingir uma melhor competência ovocitária, no entanto sua ação sobre a maturação de ovócitos de bovinos ainda não foi estudada. A kisspeptina é um peptídeo codificada pelo gene Kiss1 e possui afinidade por uma proteína G acoplada ao receptor Kiss1r (KOTANI et al., 2001). O gene Kiss1 foi originalmente identificado como supressor de metástase em humanos (LEE et al., 1996) e as primeiras indicações de sua relação com a reprodução revelaram que mutações no gene codificador do receptor da Kisspeptina, em humanos e roedores, alteraram o início da puberdade e levaram ao hipogonadismo-hipogonadotrófico (DE ROUX et al. 2003; SEMINARA et al. 2003).

A Kisspeptina contribui na função dos órgãos reprodutivos, e seu papel como potente liberador do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e do hormônio luteinizante (LH) (HAMEED et al., 2011) está bem estabelecido. Além disso, também foi sugerido sua ação não só no eixo gonadotrófico, mas também no eixo somatotrófico (AHMED et al., 2011).

Apesar de estar bem definido que a Kisspeptina atua principalmente em nível central para regular a função do ovário, há a possibilidade de efeitos adicionais em outros locais do

eixo hipotalamo-hipófise-gonada que não pode ser descartada (ROA; TENA-SEMPERE 2007). Foi descrito em ratos cíclicos a expressão do gene Kiss1 e do seu receptor nas células da teca de folículos em crescimento, granulosa, corpo lúteo, tecido intersticial e no epitélio superficial ovariano (CASTELLANO et al. 2006).

Recentemente, foram descobertas as expressões do gene Kiss1 e do receptor Kiss1r no ovário e em complexos cumulus-ovócito (COCs) de suínos e que a Kisspeptina, quando adicionada ao meio de maturação de ovócitos suínos, causou o aumento de genes maternos o pro-oncogene c-mos (MOS), fator de diferenciação de crescimento 9 (GDF9) e proteína morfogenética óssea 15 (BMP15). Assim como aumentou as taxas de expulsão do corpúsculo polar, taxa de formação de blastocisto e contagem total de células de blastocistos (SAADELDIN et al.,2012).

Assim, objetivou-se avaliar o efeito das diferentes concentrações de kisspeptina e sua interação com as gonadotrofinas na MIV de ovócitos bovinos. Para tanto foi a avaliado a competência ovocitária pela maturação nuclear, distribuição das mitocôndrias, condição de energia mitocondrial e intensidade de fluorescência das espécies reativas de oxigênio (ROS).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ovogênese

A ovogênese consiste no desenvolvimento dos ovócitos e envolve um conjunto de processos para formação e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) até a formação do ovócito haplóide fecundado (RÜSSE, 1983; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). As CGP advêm do saco vitelino e migram pelo endoderma do intestino posterior até o mesentério, depois para as pregas mesonéfricas e atingem a crista gonádica, onde se multiplicam intensamente, tornando-se hipertróficas e se distribui pelo epitélio celômico e o mesênquima (PETERS, 1970).

A crista gonádica é o primeiro estágio de desenvolvimento das gônadas de mamíferos, que compõe um relevo da parte medial dos túbulos mesonéfricos (FUJIMOTO et al. 1977). Em bovinos, por volta do 30º dia de gestação, as CGP migram do saco vitelino para a região das gônadas primitivas, onde ocorre o desenvolvimento celular e redistribuição das organelas no citoplasma, em que recebem a denominação de ovogônias (GORDON, 1994).

As ovogônias se multiplicam por mitose e entram na primeira divisão meiótica tornando-se ovócitos primários. O núcleo do ovócito passa por quase todos os estádios da prófase I (leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno), já que ocorre o primeiro bloqueio da meiose, em que o processo meiótico é interrompido permanecendo no estádio de dictióteno ou vesícula germinativa (VG) até a puberdade (FIGUEIREDO et al., 2008).

Na fase adulta, quando o animal atinge a puberdade, os ovócitos primários terminam seu desenvolvimento e retomam a meiose. O pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) induz o rompimento da VG levando a progressão para metáfase I, anáfase I e telófase I, ocorrendo assim, a expulsão do primeiro corpúsculo polar, formando o ovócito secundário. O ovócito permanece no estágio de metáfase II, em que o segundo bloqueio da divisão meiótica acontece até o ovócito ser fecundado por um espermatozoide. Após a fecundação do ovócito, ocorre a retomada da segunda divisão meiótica, com a liberação do segundo corpúsculo polar, formando o ovócito haplóide fecundado (BETTERIDGE et al., 1989).

2.2 Foliculogênese

A foliculogênese envolve a formação, crescimento e maturação folicular desde o seu estágio primordial até os estágios pré-ovulatórios e pode ser dividida em duas fases, a pré antral

e antral (SAUMANDE, 1991). A formação de folículos também começa durante o desenvolvimento fetal, quando células somáticas planas, advindas do epitélio celômico, rodeiam os ovócitos formando os folículos primordiais. Na espécie bovina, os folículos primordiais estão presentes em torno de 130 dias de vida embrionária (RÜSSE, 1983).

A fase pré antral de folículos envolve a ativação dos folículos primordiais para transformá-los em folículo em crescimento. Nesta fase os folículos podem se desenvolver em folículos primários e secundários. Os mecanismos de ativação dos mesmos ainda são pouco conhecidos, mas muitos estudos demonstraram que existem fatores de origem sistêmica e local que são responsáveis pela regulação dessa ativação (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

Os folículos primordiais, que são produzidos durante a vida fetal, não são renováveis e são o pool de reserva de folículos durante toda a vida do animal. Esses folículos possuem um ovócito rodeado por uma camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso e com membrana basal. Após sua formação, as células da pré-granulosa param de proliferar e entram em quiescência (HIRSHFIELD, 1991).

A transformação dos folículos primordiais em folículos em crescimento ocorre quando há mudanças na morfologia das células, podendo-se encontrar folículos que possuem um ovócito circundado por células da granulosa com formatos pavimentoso e cúbicos, sendo denominados como folículos intermediários (FIGUEIREDO et al., 2008).

Os folículos primários possuem uma camada de células cuboides volumosas e em maior número, que circundam os ovócitos imaturos (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997). Em fetos bovinos, os folículos primários possuem diâmetro entre 40 a 60 μm e são encontrados em fetos que apresentam 110 a 130mm de comprimento (BECKERS et al., 1996).

Os folículos secundários surgem em torno de 210 dias de gestação, e são caracterizados por possuírem pelo menos duas camadas de células cuboides. Nessa fase as células da teca podem ser vistas em torno da membrana basal e a zona pelúcida pode ser identificada em bovinos (FAIR et al., 1997). O tamanho médio do folículo se encontra entre 80 e 250 mm (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997).

As junções gap, que são projeções intercomunicantes, são formadas entre as células da granulosa e do ovócito durante o desenvolvimento do folículo secundário e estágios posteriores. São a partir dessas junções que ocorre o transporte de metabolitos, moléculas sinalizadoras e aminoácidos que são necessários à maturação ovocitária (GILCHRIST et al., 2008).

Durante a segunda metade da gestação, os folículos pré-antrais têm seu número consideravelmente reduzido. Essa perda constante deve-se aos processos apoptóticos e atresia

folicular (MOTTA; MAKABE, 1986). Os folículos secundários são mais susceptíveis à atresia que folículos primários e primordiais (SILVA et al., 2002).

Na fase antral há a formação de folículos terciários que começam a formar uma cavidade, chamada de antro, que possui secreções de células foliculares, que formam o fluido folicular. Este é constituído de fatores de crescimento, enzimas e hormônios, capazes de regular seu crescimento até a formação de um folículo pré-ovulatório ou de De Graaf (IRELAND, 1987; VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Os folículos terciários medem a partir de 120 µm de diâmetro em bovinos (LUSSIER et al., 1987).

Em bovinos, a fase antral é caracterizada pela presença de duas ou três ondas de crescimento folicular dependente de gonadotrofinas, possuindo três fases distintas, o recrutamento, seleção e dominância (IRELAND et al., 2000). O recrutamento folicular é caracterizado pela emergência de um grupo de folículos que crescem até 6 a 8 mm de diâmetro, dependendo da raça, já que animais *Bos indicus* possuem um menor tamanho folicular quando comparados com os *Bos taurus* (GINTHER, 2000). Durante essa fase ocorre o aumento do hormônio folículo estimulante (FSH) e sua ação está relacionada à estimulação e proliferação celular, produção de esteroides entre outras variedades de reações.

Na fase de desvio folicular, apenas um folículo continua seu crescimento, mudando sua dependência gonadotrófica primária de FSH para LH (GIBBONS et al., 1997). Muitos fatores estão envolvidos durante essa seleção e dominância folicular, contudo o mecanismo ainda precisa ser completamente esclarecido. Em meio a esses fatores se encontra o tamanho folicular, a produção de estradiol, o número de receptores para FSH e LH e o Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I, OLIVEIRA et al., 2011).

2.3 Competência Ovocitária

A competência ovocitária é a capacidade do ovócito de sair do estágio imaturo para uma completa maturação, buscando sustentar o desenvolvimento embrionário após a fecundação (MINGOTI et al., 2002; SIRARD, 2001). Essa competência é alcançada de forma gradual e sincronizada com o crescimento folicular. Assim, a maturação ovocitária pode ser dividida em maturação nuclear, citoplasmática e molecular. A maturação nuclear está relacionada ao desbloqueio da meiose do ovócito em estágio de VG até o segundo bloqueio em MII. A maturação citoplasmática corresponde a todas as alterações estruturais e reorganização da distribuição das organelas citoplasmáticas. A maturação molecular envolve a síntese de

proteínas e armazenamento de RNAm que controla a maturação nuclear e a citoplasmática, bem como o desenvolvimento embrionário (ANGUITA et al., 2008; SIRARD, 2001).

2.3.1 Maturação nuclear

A maturação nuclear tem como objetivo a produção de um gameta haploide, por divisão reducional dos cromossomas, em que o núcleo sai do estágio de prófase I e progride para a metáfase II da meiose. Os ovócitos são mantidos em VG por muitos anos e esse bloqueio da meiose ainda não é bem conhecido. A retomada da meiose pode ser induzida *in vivo* pelo pico de LH (BETTERIDGE et al., 1989), enquanto *in vitro* ocorre espontaneamente pela retirada dos ovócitos do ambiente folicular (PINCUS; ENZMANN, 1935).

O estágio de VG é caracterizado pela presença de um núcleo esférico rodeado por uma membrana nuclear e cromatina descondensada. Um dos primeiros sinais do desbloqueio da meiose é quando ocorre a condensação cromossômica e a membrana nuclear se desintegra, levando a formação de uma placa metafásica localizada perifericamente no ooplasma, essa fase é denominada MI. A MII é caracterizada pela extrusão do corpúsculo polar e presença dos cromossomos metafásicos na periferia do ooplasma (LANDIM-ALVARENGA; CHOI, 1999).

A indução do desbloqueio da meiose depende da ativação de uma proteína quinase, denominada de fator promotor da maturação (MPF-maturation promoting factor), que é composta por duas subunidades, uma catalítica ($p34^{cdc2}$) e reguladora (cyclina B). O MPF na sua forma inativa se encontra fosforilados nos resíduos treonina-14 e tirosina-15 da subunidade catalítica e é ativado pela desfosforilação desses resíduos pela fosfatase Cdc25 (DAI et al., 2000). A ação do MPF está relacionada com a dissolução do nucléolo e do envoltório nuclear, reorganização microtubular e condensação cromossômica (VERDE et al., 1992). A desfosforilação do MPF ocorre quando há uma diminuição do cAMP dentro do ovócito, já que o mesmo ativa a proteína quinase A (PKA) que fosforila proteínas específicas do ovócito, mantendo-o imaturo (JOSEFSBERG et al., 2003).

Durante a maturação ovocitária existe outra quinase, pertencente à família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) com função de fosforilar diversos substratos, regulando a organização microtubular e da cromatina entre outros alvos (VERLHAC et al., 1993). As MAPKs respondem a estímulos extracelulares e são ativas quando fosforiladas nos resíduos de tirosina e treonina (POSADA; COOPER, 1992). Existem duas isoformas de MAPKs encontradas em ovócitos de mamíferos que são a ERK1 e ERK2 (DEDIEU et al., 1996).

Em bovinos, de acordo com Gordo et al. (2001), pouco antes da quebra da VG ocorre a ativação do MPF e da MAPKs, sendo esta última produzida de forma gradual durante as 24 horas de maturação *in vitro*. Apesar dos ovócitos bovinos não necessitarem das MAPKs para que ocorra o desbloqueio da meiose, quando estas não estão presentes a meiose não é bloqueada novamente no estágio MII, sugerindo que estas enzimas possuem um papel importante na regulação do bloqueio da meiose.

2.3.2 Maturação Citoplasmática

O processo de maturação nuclear e citoplasmática são eventos distintos, porém interligados. Os ovócitos com uma maturação nuclear completa, em tempo regular, mas que não possuam alterações citoplasmáticas e produção de proteínas e transcritos no mesmo, não serão fecundados ou não conseguem sustentar o desenvolvimento embrionário (MEIRELLES et al., 2004).

Muitas modificações ultraestruturais nas organelas citoplasmáticas podem ser notadas no processo de maturação ovocitária, como a morfologia e a distribuição. A maturação ovocitária pode ser avaliada pela distribuição das organelas, reorganização do Retículo endoplasmático, Complexo de Golgi, grânulos corticais e mitocôndrias (MAO et al., 2014).

Reticulo endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é muito importante na sinalização intracelular, por ser o principal armazenamento interno de íons de cálcio, bem como atuar na síntese de membranas, metabolismo de lipídios e enovelamento de proteínas e sua degradação (LIPPINCOTT-SCHWARTZ, ROBERTS e HIRSHBERG, 2000). Durante a maturação dos ovócitos, alterações estruturais no RE devem acontecer para que ocorra um bom funcionamento intracelular. Em avaliações de ovócitos *in vivo* de camundongos, no estágio de VG, foi verificado a presença do RE distribuído uniformemente por todo o ooplasma, quando os ovócitos estavam em estágios MII o RE estava situado na região periférica do citoplasma do ovócito (KLINE, 2000). A reorganização do RE após a maturação ovocitária leva os íons de cálcio mais próximo a seu sitio de ação, pois umas das funções dos Ca^{2+} intracitoplasmático é bloquear a polispermia (MACHACA, 2007).

Complexo de Golgi

Em ovócitos de camundongos com configuração nuclear em VG o complexo de Golgi se encontra disperso por todo o citoplasma ovocitário, sendo mais concentrado no centro do que na periferia. Após a ativação da meiose o envelope nuclear é desmontado e o Complexo de Golgi é fragmentado e disperso por todo o citoplasma do ovócito até o estágio nuclear de MII. Para buscar uma possível função do Complexo de Golgi durante a maturação, ele foi desfragmentado antes da maturação e observou-se que ele é essencial para a quebra da vesícula germinativa mas, após esse processo ele não se torna importante para a maturação ovocitária (MORENO et al., 2002). Em ovócitos bovinos, quando o núcleo se encontra em VG, o Complexo de Golgi está íntegro e, após o reinício da meiose, transforma-se em vesículas (PAYNE; SCHATTEN, 2003). Contudo, mais estudos devem ser realizados para melhor entender a função do Complexo de golgi durante a maturação ovocitária.

Grânulos corticais

Os grânulos corticais dos mamíferos são advindos do Complexo de Golgi durante o crescimento do ovócito (AUSTIN, 1956; GULYAS, 1980; WESSEL et al., 2001). Os grânulos são dispersos por todo o citoplasma em ovócitos imaturos de bovinos (HOSOE e SHIOYA, 1997). No final da maturação, quando os ovócitos atingem o estágio de MII, os grânulos corticais migram para a periferia do ooplasma, próximo a membrana plasmática (HOSOE e SHIOYA, 1997; WESSEL et al., 2001). Os grânulos corticais são compostos de proteínas, enzimas, glicosaminoglicanas e moléculas estruturais que são importantes na prevenção da polispermia. Quando o ovócito é fertilizado ocorre a exocitose dos grânulos corticais que fazem modificações na matriz extracelular do ovócito, fazendo que o mesmo não seja fecundado por outro espermatozoide (HALEY; WESSEL, 2004).

Mitocôndrias

A principal função das mitocôndrias é sintetizar o Trifosfato de Adenosina (ATP), sendo extremamente importante no fornecimento de energia que é consumida durante a maturação (STOJKOVIC et al., 2001). Assim, o movimento das mitocôndrias para áreas que requerem alto consumo de energia é importante. Em ratos, quando os núcleos dos ovócitos se encontram em VG, as mitocôndrias se encontram agregadas em torno da mesma, quando ocorre a ruptura

da VG, as mitocôndrias se afastam da periferia e ocupam a maior parte do volume dos ovócitos em MII (DUMOLLARD et al., 2006).

Em suínos e bovinos foi observado uma extensa movimentação das mitocôndrias para o interior do citoplasma durante a maturação dos ovócitos em grupos com alta competência ovocitária (STOJKOVIC et al., 2001; SUN et al., 2001; BREVINI et al., 2005; SOMFAIA et al., 2012). Em equinos, considera-se como característica da maturação citoplasmática completa (AMBROUSI et al., 2009) quando a acumulação de mitocôndrias se encontra na periferia do citoplasma do ovócito (padrão pericortical) e/ou em torno do núcleo (perinuclear e pericortical/padrão perinuclear).

A reorganização das mitocôndrias também está relacionada com a produção de ATP, pois a formação de grandes aglomerados de mitocôndrias está associada ao aumento da produção de ATP. Existem três distintos aumentos na produção de ATP durante a maturação: a primeira fase do aumento ocorre quando há a quebra da VG, a segunda quando ocorre a fase mais longa de migração do fuso e a terceira fase ocorre durante a transição da meiose I (MI) para MII (YU et al., 2010).

A cadeia respiratória mitocondrial produz espécies reativas de oxigênio (ROS), que incluem ânions superóxidos (O_2^-), peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxilas (OH), durante a quebra de ATP. Radicais livres são substâncias pró-oxidantes que em excesso causam estresse oxidativo nas células, causando consequências irreversíveis, como a apoptose celular (GUERIN, MOUATASSIM e MENEZO, 2001).

Em ambientes de cultivo celular, a concentração de oxigênio (20%) é bem superior a aquela encontrada *in vivo* (3 a 9%), assim a concentração de ROS intracelular tende a aumentar nos sistemas de cultivo *in vitro* (MASTRIOANNI; JONES, 1965). Em camundongos, uma elevada concentração de ROS prejudica a maturação ovocitária pois diminui a proporção de ovócitos que atingem a MII (ZHANG et al., 2009). As ROS causam danos no DNA, RNA, proteínas e nas funções mitocondriais (COMPORTEI, 1989), como também inibe a fecundação do ovócito pelo espermatozoide (AITKEN et al., 1993). Assim, para diminuir o estresse oxidativo durante o cultivo, substâncias com função antioxidante devem ser adicionados ao meio.

2.3.3 Maturação molecular

A maturação molecular está relacionada ao armazenamento, transcrição e processamento de mRNA que são expressos pelos cromossomos e traduzidos pelos ribossomos

em proteína. Durante a fase de foliculogênese, que o núcleo está quiescente, ocorre a transcrição e estoque de mRNA, tendo a maior parte na forma inativa (GOTTARDI; MINGOTI, 2009). O armazenamento dos transcritos é de extrema importância, pois com a retomada da meiose não há possibilidade da expressão gênica (SIRARD, 2001). Assim, falhas no armazenamento, processamento e recrutamento do mRNA materno irá interferir na competência ovocitária. Desta maneira, tudo que foi processado durante o crescimento deve ser metabolizado no momento certo. As proteínas produzidas a partir desse mRNA são muito importantes na maturação do ovócito, na fertilização e na fase inicial do desenvolvimento embrionário (CROCOMO et al., 2013).

2.4 Kisspeptina

A Kisspeptina é um peptídeo que se liga ao receptor Kiss1R, sendo codificada pelo gene Kiss1. O gene Kiss1 foi o primeiro elemento do sistema a ser identificado e foi descoberto em 1996, por Lee e colaboradores, por uma técnica de hibridação em linhas de células de melanoma, com diferentes capacidades metastáticas, que identificaram a expressão de um mRNA KISS1 em células tumorais com baixa capacidade de invasão.

O receptor Kiss1R, anteriormente conhecido como GPR54, foi descrito primeiramente como um receptor órfão acoplado a uma proteína G com semelhanças estruturais aos receptores transmembranares de galanina (LEE et al., 1999). Os peptídeos naturais que apresentam uma atividade agonista sobre o receptor Kiss1R foram isolados e identificados em placenta, testículos, intestino delgado e pâncreas em humanos e roedores. Esses peptídeos são derivados de Kiss1 e, portanto, foram designados Kisspeptinas (KOTANI et al., 2001; OHTAKI et al., 2001).

O gene Kiss1 codifica uma proteína de 145 aminoácidos e seu principal produto é um peptídeo de 54-aminoácidos, denominado Kisspeptina-54 (Kp-54) (OHTAKI et al., 2001). Além disso, outros derivados do Kiss1 foram identificados como a Kisspeptina-14 (Kp-14), Kisspeptina-13 (Kp-13) e Kisspeptina-10 (Kp-10). Todos os subprodutos da KISS1 podem ativar efetivamente o Kiss1R, contudo as formas menores são mais ativas que a Kp-54 (KOTANI et al., 2001).

As primeiras indicações da relação da Kisspeptina com a reprodução foram descobertas em humanos que sofreram de hipogonadismo hipogonadotrófico, uma rara condição de infertilidade de origem central, devido a mutações genéticas e perda da funcionalidade do gene Kiss1R (DE ROUX et al., 2003; SEMINARA et al., 2003). Tais descobertas foram reforçadas

pelo trabalho, publicado no mesmo ano, com ratos que possuíam mutações no gene Kiss1R, o qual revelou anormalidades no desenvolvimento dos órgãos genitais (FUNES et al., 2003).

2.4.1 Sinalização da Kisspeptina via Kiss1R

As vias de sinalização da resposta do Kiss1R sobre ação da Kisspeptina já foram relatados por pesquisadores há mais de quinze anos (KOTANI et al., 2001; OHTAKI et al., 2001; MUIR ET AL., 2001), contudo pouco ainda se comprehende a cerca de tal resposta. As características da sinalização foram evidenciadas na regulação da secreção de hormônios, funções neuroendócrinas, como também no controle da proliferação e migração celular.

O mapeamento das vias de sinalização empregues por Kiss1R foi iniciado em diferentes sistemas de células heterólogas, tais como CHO-K1 (célula de ovário de hamster), HEK293 (célula renal de embrião humano), e B16-BL6 (célula do melanoma de roedores), em que os diferentes produtos do gene Kiss1 eram capazes de se ligar e ativar receptores Kiss1R em humanos e roedores. A caracterização bioquímica demonstrou que o Kiss1R é formado por sete domínios transmembranares, com o terminal amino no meio extracelular e o terminal carboxila no meio intracelular acoplados a uma proteína Gq. A ativação desse receptor conduz ao aumento intracelular de íons Ca^{+2} , sem alterações detectáveis em níveis intracelulares de 3'-5' adenosina monofosfato cíclico (AMPc), portanto sugerindo a falta de associação das proteínas Gs e Gi (KOTANI et al., 2001; MUIR et al., 2001).

A proteína Gq está envolvida na ativação da enzima fosfolipase C (PLC) que degrada o fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP2) presente na membrana em 1,4,5 trifosfato de inositol (IP3) e 1,2 diacilglicerol (DAG). O IP3, dada sua estrutura hidrossolúvel, migra pelo citosol e se liga a receptores específicos de IP3 no retículo endoplasmático e mitocôndrias, promovendo a liberação do íon Ca^{+2} no citosol (KOTANI et al., 2001; MUIR et al., 2001; STAFFORD et al., 2002).

A ativação desse receptor leva a formação do DAG que fica associado à membrana plasmática que tem a função de ativar a proteína quinase C (PKC), uma enzima ligada à membrana plasmática que promove a fosforilação de radicais em diversas proteínas intracelulares. Dentre essas proteínas estão as proteínas-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), que podem contribuir para os efeitos antimetástaticos e antiproliferativos da Kisspeptina (RINGEL et al., 2002; KOTANI et al., 2001).

As principais MAPKs envolvidas são as ERK 1, ERK 2 e p38. Estudos iniciais demonstraram que, após a exposição a Kisspeptina, as células CHO-K1 que expressam

estavelmente o Kiss1R, fosforilaram o ERK1 e ERK2, juntamente com uma menor ativação de p38 (KOTANI et al., 2001). Entretanto, em células cancerígenas de tireoide que expressaram o Kiss1R, a Kisspeptina induziu a fosforilação de ERK1, ERK 2, mas não da p38 (RINGEL et al., 2002). Em células do tumor de pâncreas, a Kisspeptina estimulou a fosforilação de ERK1 em duas linhas de células diferentes, AsPC-1 (antígeno específico de carcinoma pancreático humano) e PANC-1 (célula de pâncreas humano), e a p38 foi ativada apenas em PANC-1 (MASUI et al., 2004). Assim, esses estudos comprovam que os mecanismos de sinalização são diferentes em cada tipo de células, levando à necessidade de novos estudos acerca dos mapeamentos de tais vias.

A Kisspeptina também possui a capacidade de inibir a sinalização e quimiotaxia que é induzida pelo fator derivado de células do estroma- 1 (SDF-1/ CXCL12), pois a ativação do Kiss1R pode regular negativamente a função do seu receptor CXCR4. A Kp10 e seu receptor inibem, parcialmente, a sinalização pelo bloqueio da mobilização de íons de cálcio e fosforilação de Akt (Proteína Kinase B) que seriam induzidas pelo SDF-1. Esta descoberta dá suporte para explicar a capacidade da Kisspeptina em inibir a metástase (NAVENOT et al., 2005).

2.4.2 Ação da Kisspeptina na hipófise e hipotálamo

A Kisspeptina foi detectada no hipotálamo dos roedores no núcleo anteroventral periventricular (AVPV), núcleo arqueado (ARC), região periventricular (PeV) (GOTTSCH et al., 2004; CLARKSON E HERBISON, 2006), como também foi identificada em áreas na porção rostral do terceiro ventrículo e no núcleo dorso medial (CLARKSON et al., 2009). Nos mamíferos, os neurônios que possuem a Kisspeptina estão distribuídos em duas principais regiões: na área pré-óptica (POA) do PeV e no ARC (FRANCESCHINI et al., 2006).

Os neurônios de Kisspeptina estão distribuídos de forma semelhantes entre os ambos os sexos, e aumenta potencialmente durante o desenvolvimento. Contudo um número maior de corpos celulares é encontrado no AVPV em ratas (CLARKSON E HERBISON, 2006). Os esteroides sexuais podem interferir na expressão de mRNA do Kiss1 em neurônios no AVPV (SMITH et al., 2006). Em ratos (SMITH et al., 2005) e porcos (TOMIKAWA et al., 2010) o estradiol aumenta mRNA do Kiss1 na região da POA-PeV. Em ovelhas adultas o estradiol inibe a expressão de Kiss1 (SMITH et al., 2007) e, em animais que foram ovariectomizados, houve um aumento no número de neurônios de Kisspeptina imunorreativos no ARC (MERKLEY et al., 2012).

A distribuição dos neurônios de Kisspeptina no hipotálamo levou a acreditar que ela seria um neurotransmissor que afetaria direta ou indiretamente a liberação de GnRH, levantando a sugestão que os AVPV ou o ARC seriam responsáveis pela regulação desse hormônio (GU e SIMERLY, 1997). Assim, para investigar se os neurônios de GnRH eram susceptíveis à ação da Kisspeptina, fatias do cérebro de ratas adultas foram estudadas e foi constatado que a Kisspeptina ativa de forma direta os neurônios de GnRH e que poderiam ser potencializadas na presença do estradiol (PIELECKA-FORTUNA et al., 2008).

Estudos têm comprovado que várias espécies expressam tanto o Kiss1, quanto o Kiss1R na hipófise e que a kisspetina possui ação direta em células da hipófise de roedores (GUTIÉRREZ-PASCUAL et al., 2007), porco e bovino (SUZUKI et al., 2008). Em um estudo realizado por Navarro et al (2005) foi relatado que a Kisspeptina estimulou significativamente a liberação de FSH *in vivo*, contudo não conseguiu obter liberação basal de FSH de forma direta a nível de pituitária, embora estimulada pelo GnRH, houve uma liberação reforçada de FSH *in vitro*. Assim, forneceram a evidência do papel da Kisspeptina como estimulador da liberação de FSH, mesmo que em pequenas quantidades.

Em cultura de células da hipófise de bovinos e porcos na presença de meio enriquecido com Kp-10 foi observado um aumento na quantidade de LH liberado, sugerindo assim um efeito direto da Kisspeptina sobre a hipófise (SUZUKI et al., 2008). Witham et al. (2013) relataram um aumento na expressão de Kiss1R na pituitária de ratos quando o pico de LH foi induzido pelo estradiol, sugerindo uma possível ação da Kisspeptina nesse processo reprodutivo.

A administração central de kp-10 em ovelhas estimulou a liberação de GnRH, que pode ser encontrado em altas concentrações no líquido cefalorraquidiano, como também aumentou as concentrações circulantes de LH (MESSAGER et al., 2005). A ação da Kp-10 em culturas de células da pituitária de ovelhas, que estavam na fase folicular do ciclo estral, aumentou a concentração de LH em 80%. Contudo, a liberação de LH estava mais relacionada à liberação de GnRH pelo hipotálamo do que a ação direta da Kisspeptina sobre a hipófise, já que quando desconectado o eixo hipófise hipotálamo, ovelhas não responderam ao tratamento com kp-10, pois não houve aumento das concentrações circulantes de LH (SMITH et al., 2008).

A Kisspeptina pode ser responsável pela estimulação do pico de LH que leva à ovulação, já que em ovelhas tratadas com infusão intravenosa constante de Kp-10 após a retirada do implante (CIDR, InterAg, Hamilton, New Zealand), ocorreu o aumento das concentrações de LH e um aumento prematuro de progesterona na circulação quando comparado às ovelhas tratadas apenas com veículos (CARATY et al., 2007). A administração central do antagonista da Kisspeptina, o peptídeo 234 (p-234), em ovelhas reduziu a amplitude do pulso de LH a ponto

de impedir a freqüência do pulso e reduzir as concentrações médias de LH (ROSEWEIR et al., 2009)

A Kp-10 também estimulou o aumento das concentrações circulantes de LH em vacas da raça holandesa, 100 pmol de Kp-10 foi capaz de causar o aumento do LH circulante. No entanto, a fase de lactação afetou a ação da Kisspeptina sobre a secreção de LH, vacas que estavam na quinta semana de lactação tiveram maior concentração de LH quando comparadas àquelas que estavam na primeira e décima primeira semana de lactação (WHITLOCK et al., 2011).

2.4.3 Kisspeptina e sua ação no trato reprodutivo

A função da Kisspeptina no eixo hipotalâmico e hipófise foi descrita por vários pesquisadores, contudo sua interação no trato reprodutivo ainda está sendo descoberta. A expressão de mRNA de Kiss1R em ovários de ratos, trouxe a evidencia de que esse peptídeo não teria apenas uma função central (TERAO et al., 2004). Trabalhos realizados posteriormente identificaram, por imunohistoquímica, a expressão de Kisspeptina e de seu receptor em ovários e oviduto de ratos (CASTELLANO et al., 2006; GAYTÁN et al., 2009; GAYTÁN et al., 2007), ovários de humanos (GAYTÁN et al., 2009), de peixes (NOCILLADO et al., 2007) e de suínos e caprinos (INOUE et al., 2009).

A expressão dos mRNA de Kiss1 e Kiss1R em ovários foram avaliados ao longo do ciclo estral de ratos e ambos foram detectados por todo o período do ciclo. No entanto, os níveis de mRNA de Kiss1 foram alterados durante o ciclo estral de uma forma cíclico-dependente, já que houve um aumento significativo no período pré ovulatório. As gonadotrofinas, LH e coriônica humana (hCG), são capazes de aumentar os níveis de mRNA de Kiss1 antes da ovulação, o que sugere a ação da Kisspeptina de forma direta no processo ovulatório (CASTELLANO et al., 2006). Assim, quando a ovulação é interrompida, com a administração de indometacina (inibidor da ciclo-oxigenase-2 COX-2), ocorre uma diminuição considerável dos níveis de mRNA de Kiss1, mas não do mRNA de Kiss1R (GAYTÁN et al., 2009).

A constatação que o Kiss1 e o Kiss1R são expressos no útero de ratos, levaram a alusão de que a Kisspeptina estaria envolvida no processo de implantação de embriões. Há pouco tempo, foi descoberto que a Kisspeptina interfere na implantação de embriões de ratos. Dessa forma, ratos com endométrio $KISS1^{-/-}$ exibiram níveis muito reduzidos de fator inibidor de leucemia (LIF), uma citocina que é essencial para a implantação de embriões em camundongos. Com base nestes achados, foi sugerido que a Kisspeptina interfere na sinalização uterina, que é

interrompida no útero de animais $KISS1^{-/-}$, regulando os níveis de LIF e secreção glandular e, assim, interferindo na implantação do embrião (CALDER et al., 2014).

Foi descoberto recentemente que a Kisspeptina e seu receptor são expressas em células estromais decidualizadas de ratas prenhas. A expressão do Kiss1R coincidiu com o tempo de implantação do embrião. Assim, uma cultura do estroma decidualizado foi feita para avaliar a expressão dos genes kiss1 e Kiss1R, identificando uma maior concentração destes quanto maior a progressão da decidualização (ZHANG et al., 2014).

A Kisspeptina e seu receptor foram expressas em células de trofoblastos durante o primeiro trimestre de gestação em humanos (ROSEWEIR et al., 2012), e em ratos foram encontrados coincidentemente com o pico de invasão trofoblástica, sendo este fundamental para o estabelecimento da gestação (HIDEN et al., 2007). A invasão do trofoblasto assemelha-se mecanicamente à invasão de células tumorais, mas difere-se dela pelo fato de serem reguladas rigorosamente por diferentes fatores, incluindo citocinas e hormônios. Dessa forma, um novo fator foi descoberto, a Kisspeptina, já que ela reprimiu a invasão do trofoblasto via ligação ao seu receptor Kiss1R (HIDEN et al., 2007; ROSEWEIR et al., 2012).

Em bovinos, cotilédones coletados no primeiro trimestre de gestação foram cultivados em meios contendo Kp-10 e efeitos inibitórios da proliferação em linhas de células isoladas no segundo mês de gestação foram detectadas, contudo, também foi encontrado um efeito estimulatório sobre a proliferação em linhas de células coletadas no terceiro mês de gestação (MARTINO et al., 2015). Portanto, novos estudos acerca da ação da Kisspeptina devem ser realizados para melhor identificar sua função na placentação de animais.

Um número cada vez maior de estudos vem sendo publicados na tentativa de evidenciar as principais funções da Kisspeptina na reprodução animal. Desse modo, Saaldeldin et al. (2012) verificaram o efeito desse peptídeo na produção *in vitro* de embriões de suínos, já que em humanos e roedores os genes Kiss1 e Kiss1R foram encontrados, principalmente, nas camadas da teca de folículos em crescimento, glândulas intersticiais, corpos lúteos e epitélio da superfície do ovário (CASTELLANO et al., 2006; GAYTÁN et al., 2009).

Os genes Kiss1 e Kiss1R foram expressos tanto nas células da granulosa quanto no ovócito de suínos, e o receptor foi encontrado em blastocistos após a eclosão, mas não em blastocistos expandidos. Ovócitos maturados com $10^{-6}M$ de kp-10 aumentaram, significativamente, a maturação ovocitária, taxas de formação de blastocisto, blastocistos eclodidos, contagem total de células de blastocistos, como também aumentou a expressão de genes maternos como proteína do pro-oncogene c-mos (MOS), fator de diferenciação de crescimento 9 (GDF9) e proteína morfogenética óssea-15 (BMP15). Contudo, embriões

cultivados em meios contendo Kisspeptina apresentaram impedimento do crescimento trofoblastico, causando sua degeneração, bem como aumentou genes pró-apoptóticos (BAK1) 3,5 vezes mais quando comprados a aqueles sem Kisspeptina (SAADELDIN et al.,2012).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos da Sigma (Sto Louis MO, USA), a menos que esteja indicado de outra forma. A kisspeptina-10 murina (YNWNSFGLRY-NH₂) foi fabricada pela empresa American Peptide Company Inc (Vista, CA, USA). O FSH (Folltropin®) e o LH (Lutropin-V®) foram pela Bioniche Inc., (Belleville, Canadá). Todos os meios utilizados para MIV de ovócitos bovinos foram produzidos no laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia (ANEXO A).

3.2 Obtenção e seleção dos complexos címulos ovócitos

Os ovários foram coletados em abatedouro comercial no município de Uberlândia-MG. O transporte ocorreu em garrafa térmica em um período máximo de quatro horas. Imediatamente após a chegada dos ovários ao Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia, os folículos ovarianos, com diâmetro entre 3-8 mm, foram puncionados com o auxílio de uma agulha calibre 18G acoplada a uma seringa de 5mL. O fluído folicular contendo os complexos cumulus ovócitos (COCs) foi depositado em tubos plásticos de 15 mL com tampa em banho Maria, mantidos a 36°C. Após 10 minutos, o sedimento foi transferido para placas de Petri, e avaliado sob microscópico estereoscópico (Olympus Optical®, modelo SZ-40/ SZ-ST), para o rastreamento dos COCs.

A classificação dos ovócitos foi pelo método de Stojkovic et al. (2001), em que os COCs são classificados em Grau I (núcleo e ooplasma homogêneo e com mais de cinco camadas de células do cumulus), Grau II (COCs compactos com cinco ou mais camadas de células do címulo ou ovócito com citoplasma levemente heterogêneo), Grau III (ovócitos parcialmente desnudos, mostrando remoção de células do cumulus em menos de um terço da superfície da zona pelúcida), desnudos e atrésicos. Apenas ovócitos Grau I foram utilizados, os mesmos foram lavados três vezes em meio de lavagem - Base TCM-199 Hepes acrescida de 10% de soro fetal bovino (Cutilab®, Campinas, Brasil), solução de piruvato (22µg/mL) e amicacina (83 mg/mL, TEUTO, Anápolis, Brasil).

3.3 Delineamento experimental

Experimento 01: Identificação da quantidade mínima de Kisspeptina-10 para a maturação ovocitária

Para a suplementação de Kisspeptina, durante a maturação foi necessário identificar a quantidade mínima de Kisspeptina capaz de realizar a maturação dos ovócitos. Para tanto, foi utilizado como embasamento a adição de $10^{-6}M$ de Kp-10 usada em experimentos durante a MIV de ovócitos de suínos (SAADELDIN et al. 2012).

Os ovócitos foram distribuídos em quatro tratamentos com diferentes concentrações de Kp-10 (0; 10^{-7} ; 10^{-6} ou 10^{-5} M), em meio de maturação, constituído de meio base TCM-199 com bicarbonato acrescida de 10% de soro fetal bovino, piruvato de sódio (22 μ g/mL), amicacina (83mg/mL), FSH (0,5 μ g/mL). Os ovócitos foram incubados em estufa à 38,5°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ durante 24 horas.

Experimento 02: Desenvolvimento de um meio de maturação contendo Kisspeptina e gonadotrofinas

Após a definição da dosagem ideal de Kp-10 capaz de melhorar a maturação nuclear e citoplasmática, foi identificado seu efeito no processo de MIV em relação aos outros hormônios. Para isto, os ovócitos foram cultivados em meio MIV acima citado com adição de Kp-10 e/ou gonadotrofinas conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Desenho Experimental

Hormônios	
Controle negativo – sem hormônios	
FSH (0,5μg/mL)	
FSH (0,5μg/mL) + Kp ($10^{-7}M$)	
FSH (0,5μg/mL) + LH (5 μg/mL)	
FSH (0,5μg/mL) + LH (5 μg/mL) + Kp ($10^{-7}M$)	
Kp ($10^{-7}M$)	

3.4 Coloração dos ovócitos

Após a maturação, os ovócitos foram desnudados, separando os ovócitos das células do cumulus por pipetagens consecutivas e três lavagens em solução PBS acrescido de BSA (0,4%). Para a avaliação da distribuição e intensidade de fluorescência das mitocôndrias, os ovócitos foram incubados durante 30 minutos em PBS com 0,4% de BSA contendo 280 nM MitoTracker® Orange CMTMRos (Invitrogen, Molecular Probes, M7510) em 38,5°C sob 5% de CO₂. Após este processo, os ovócitos foram lavados três vezes em PBS e incubados no mesmo meio contendo 10µM de 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF, H2DCFDA, D6883, Sigma Aldrich) por 30 minutos em 38,5°C e sob 5% de CO₂, para marcar as espécies reativas de oxigênio (ROS). Os ovócitos foram lavados três vezes em PBS e fixados em paraformaldeído 4% por 15 minutos em temperatura de 36°C. Após a fixação, os ovócitos foram lavados em gotas contendo solução de PBS e colocados em lâmina de microscópio adicionando uma gota do meio de montagem Fluoroshield™ com DAPI (Sigma Aldrich, F6057), para marcar a configuração cromossômica dos ovócitos. A lâmina foi coberta por uma lamínula, de modo que não comprimisse os ovócitos e foi estocada ao abrigo da luz entre 4 e 8°C até ser avaliada. A avaliação foi feita em um microscópio EVOS® FL (Life Technologies, AMF 430, DAPI: 360 nm de excitação, emissão 460 nm; DCF: 495 nm de excitação, 519 nm de emissão; MitoTracker Orange: 551nm de excitação, 576 nm de emissão).

3.5 Avaliação da competência ovocitária

Para realizar a medição da intensidade de fluorescência de ROS e das mitocôndrias dos ovócitos foi utilizado o programa *ImageJ*. Para cada imagem, foram realizados os seguintes procedimentos: marcação do ovócito e medição do número de partículas; marcação e medição do número de partículas de 4 áreas diferentes do fundo; cálculo da média do número de partículas do fundo; subtração do valor encontrado no ovócito pelo valor encontrado no fundo, afim de retirar a interferência do fundo na análise realizada.

A avaliação nuclear dos ovócitos bovinos foi classificada em três fases: Vesícula Germinativa (VG), metáfase I (MI) e metáfase II (MII) com a extrusão do corpúsculo polar, sendo considerado como maturação nuclear aqueles ovócitos em MII com a extrusão do corpúsculo polar.

A distribuição mitocondrial foi classificada de acordo com Brevini et al. (2005) com adaptações, em que a distribuição mitocondrial periférica foi caracterizada pela localização das mitocôndrias ativas sob a membrana plasmática. A distribuição semiperiférica considerou a movimentação da mitocôndria da região periférica em direção ao centro até o ponto médio do raio do ovócito, no entanto, a parte central ainda permanecia livre de mitocôndrias. A distribuição difusa foi caracterizada pela localização das mitocôndrias em todo o citoplasma, contudo foi dividida de acordo com os tamanhos dos grânulos em aglomerados e granulada. Ovócitos que continham as mitocôndrias distribuídas por todo o citoplasma foram considerados de maior competência ovocitária.

3.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do software *Statistical Analysis System* for Windows SAS® (SAS, 2016). As variáveis contínuas foram avaliadas quanto à normalidade dos resíduos pelo procedimento UNIVARIATE e submetidas ao teste de Bartlett para analisar a homogeneidade das variâncias. Para determinar o efeito dos tratamentos nas variáveis resposta, os dados foram analisadas pelo procedimento GLIMMIX do SAS. Os dados de intensidade de fluorescência do MitoTracker® Orange CMTMRos e DCF foram transformados em logarítmico na base 10. As variáveis dependentes de distribuição normal (paramétricas) foram expressas em média. A significância estatística foi estabelecida como $P \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Experimento 01

Ovócitos maturados apenas com o FSH resultaram em menor maturação nuclear quando comparados àqueles maturados com a Kisspeptina-10 nas diferentes concentrações. A porcentagem de ovócitos em estágio de MII foi maior nos tratamentos que continham a Kisspeptina ($P = 0,0001$, Tabela 2). Na figura 1 são mostrados os estágios de maturação nuclear dos ovócitos em Vesicula Germinativa, Metafase I e Metafase II com extrusão do corpúsculo polar. Não houve diferença na distribuição mitocondrial entre os tratamentos (Tabela 2, $P > 0,05$).

Tabela 2 – Distribuição mitocondrial e maturação nuclear de ovócitos bovinos maturados in vitro, em diferentes concentrações de Kisspeptina-10

Tratamento (n)	Distribuição mitocondrial			Maturação Nuclear (%)	
	Periférica/ Semiperiférica (%)	Difusa Aglomerados/ Grânulos (%)			
		Aglomerados (%)	Grânulos (%)		
FSH (33)	0,09 ^A	0,91 ^A		0,39 ^A	
FSH + 10^{-7} M Kp-10 (35)	0,17 ^A	0,83 ^A		0,80 ^B	
FSH + 10^{-6} M Kp-10 (34)	0,18 ^A	0,82 ^A		0,88 ^B	
FSH + 10^{-5} M Kp-10 (32)	0,12 ^A	0,88 ^A		0,84 ^B	

Notas: Valores seguidos por letras diferentes na coluna, diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

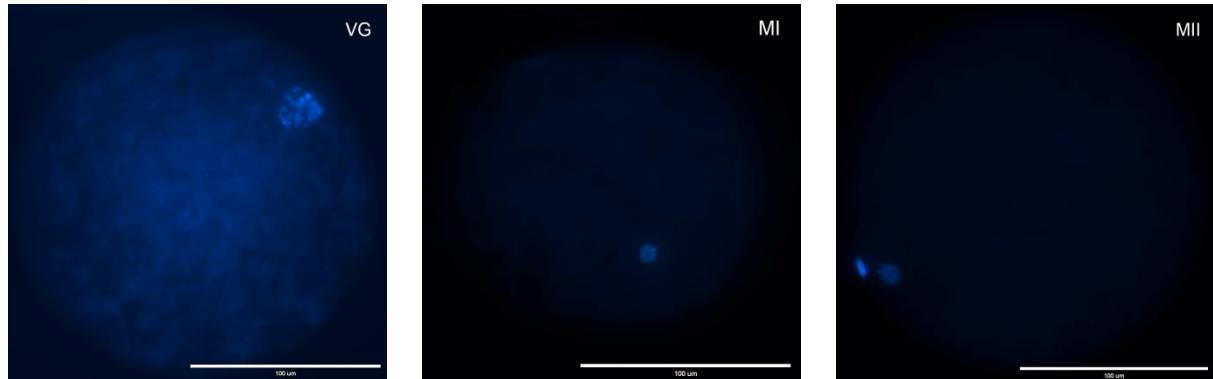
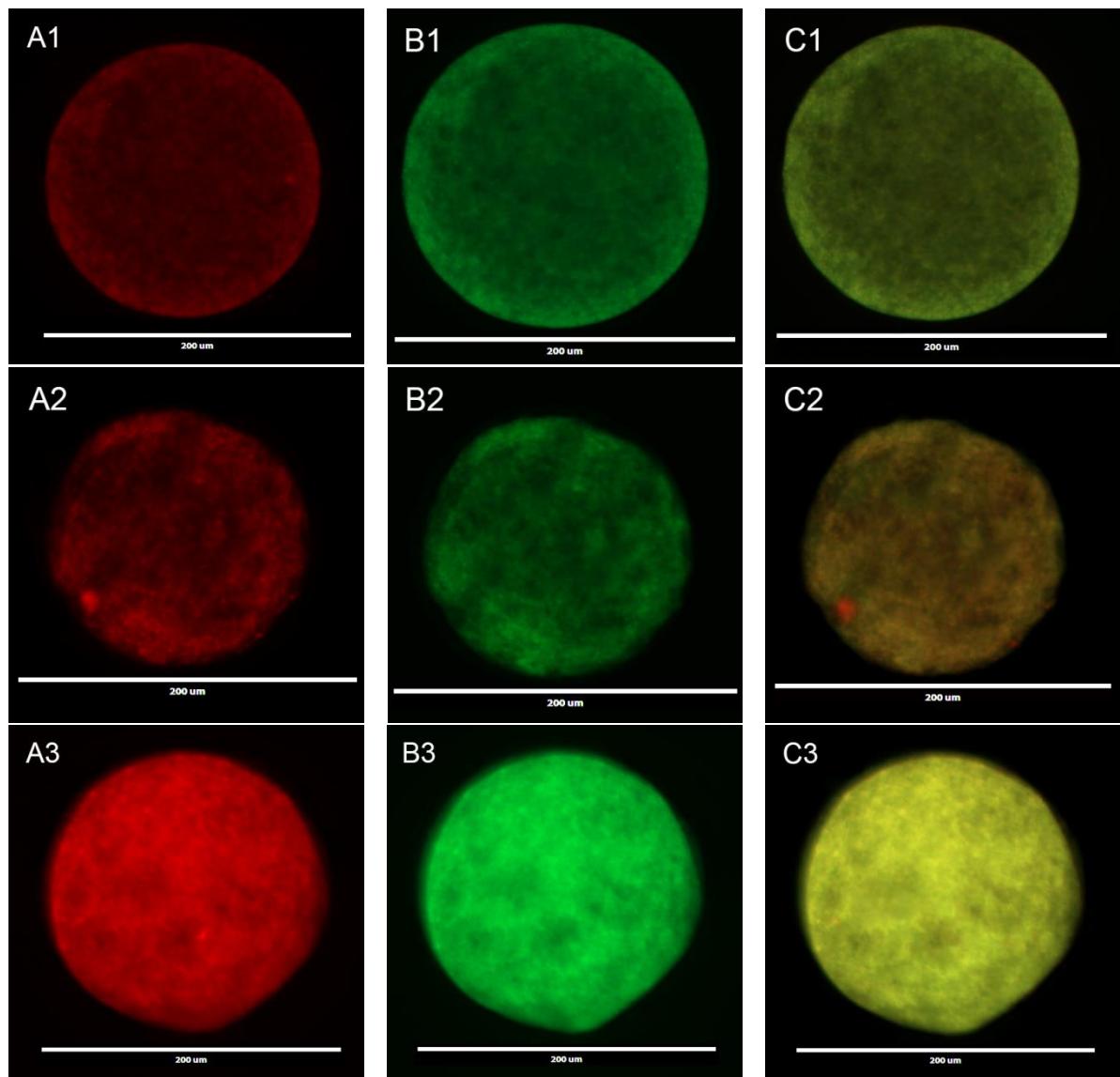


Figura 1 - Estágios de maturação nuclear dos ovócitos

Notas: (VG) Vesícula Germinativa: núcleo esférico rodeado por uma membrana nuclear e cromatina descondensada; (MI) Metáfase I: condensação cromossômica e a sem membrana nuclear e formação de uma placa metafásica localizada perifericamente no ooplasma; (MII) Metáfase II: extrusão do corpúsculo polar e presença dos cromossomos metafásicos na periferia do ooplasma Microscópio de Epifluorescência EVOS® FL, aumento 40x;

Na figura 2 são apresentados os diferentes tipos de distribuições mitocondriais encontradas em ovócitos de bovinos, como uma distribuição periférica, semiperiférica, difusa em aglomerados e em grânulos, com os correspondentes ROS encontrados intracelular e o overlay dessas duas imagens. A intensidade de fluorescência do Mitotracker CMTMRos Orange, que indica a condição de energia do ovócito, não variou entre os tratamentos ($P > 0,05$). Os valores da intensidade de DCF, que demonstra os níveis intracelulares de ROS, variaram entre os tratamentos, pois ovócitos maturados com Kp-10 apresentaram menor intensidade de DCF e quando a concentração desse peptídeo era aumentada nos meios, menor a intensidade de DCF foi encontrada (Figura 3, $P < 0,05$).



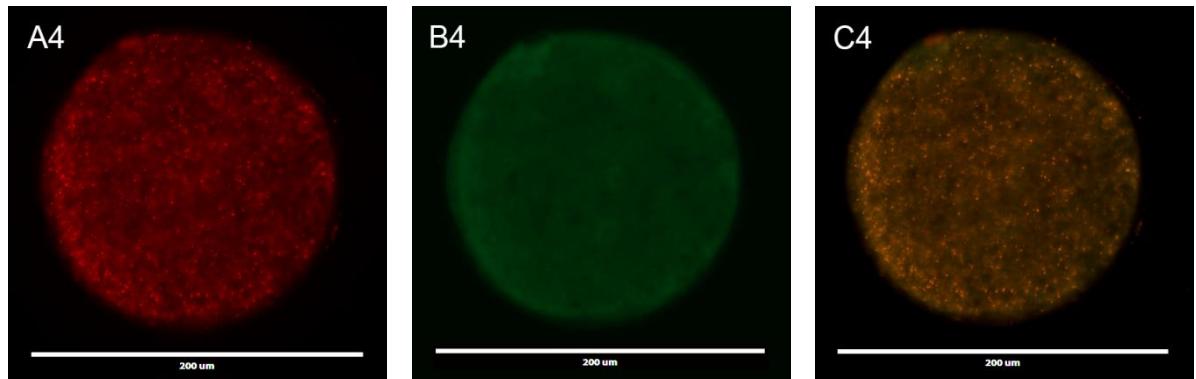


Figura 2 - Distribuição mitocondrial de ovócitos corados com MitoTracker® Orange CMTMRos e ROS com DCF

Notas: Ovócitos corados com MitoTracker® Orange: (A1) *Dist. Periférica*: localização das mitocôndrias ativas sob a membrana plasmática; (A2) *Dist. Semiperiférica*: movimentação da mitocôndria da região periférica em direção ao centro até o ponto médio do raio do ovócito, no entanto, a parte central ainda permanecia livre de mitocôndrias; (A3) *Dist. Aglomerados*: localização das mitocôndrias em todo o citoplasma em aglomerados (A4) *Dist. Granulada*: localização das mitocôndrias em todo o citoplasma em grânulos. Ovócitos corados com DCF (ROS): (B1/B2/B3/B4); Overlay MitoTracker® Orange CMTMRos + DCF: (C1/C2/C3/C4); Microscópio de Epifluorescência EVOS® FL, aumento 20x;

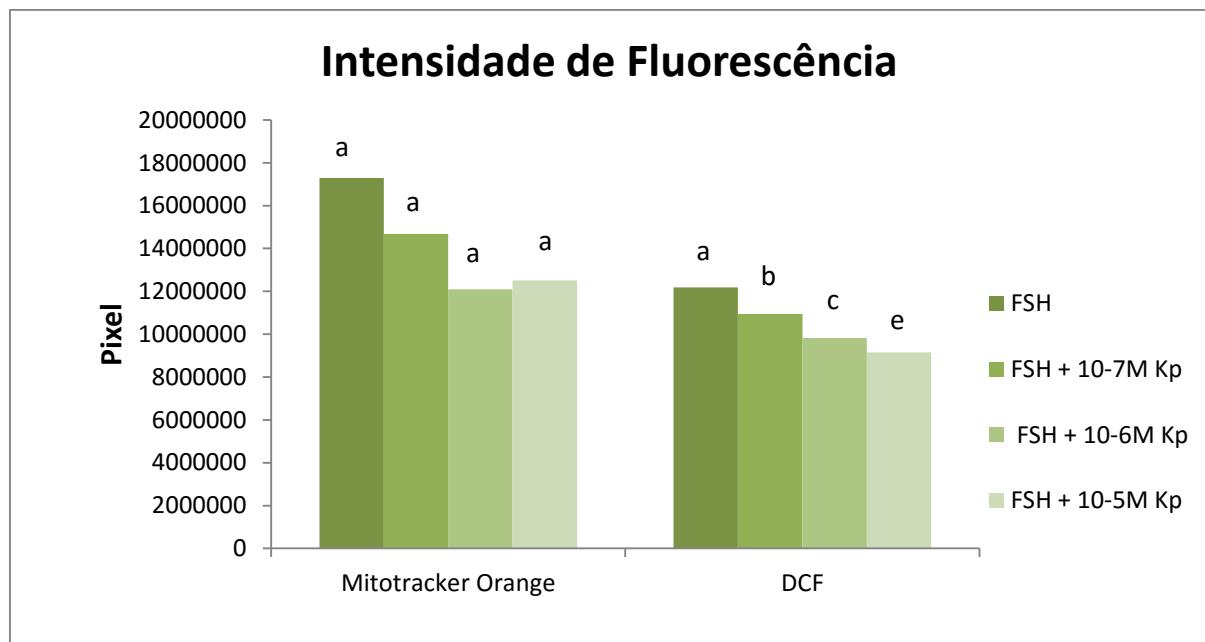


Figura 3- Intensidade de fluorescência do Mitotracker CMTMRos Orange e de DCF de ovócitos bovinos maturados in vitro, em diferentes concentrações de Kisspeptina-10

Experimento 02

A distribuição de mitocôndrias foi diferente entre os tratamentos, pois aqueles ovócitos maturados apenas com Kisspeptina-10 ou FSH+LH, tiveram uma maior quantidade de ovócitos com uma reorganização difusa do que aqueles que foram maturados apenas com o FSH ($P = 0,0216$) ou sem a adição de hormônios ($P = 0,0378$). O tratamento que não tinha hormônios resultou em menor maturação nuclear do que os demais tratamentos (Tabela 3, $P = 0,0094$).

Tabela 3 – Distribuição mitocondrial e maturação nuclear de ovócitos bovinos maturados in vitro, em diferentes meios de maturação.

Tratamento (n)	Distribuição mitocondrial		
	Periférica/ Semiperiférica	Difusa Aglomerados/ Grânulos (%)	Maturação Nuclear (%)
	(%)		
Sem hormônios (18)	0,33 ^A	0,67 ^A	0,28 ^A
FSH (38)	0,33 ^A	0,67 ^A	0,61 ^B
FSH + Kp-10 (30)	0,24 ^{AB}	0,76 ^{AB}	0,72 ^B
FSH + LH (35)	0,08 ^B	0,91 ^B	0,79 ^B
FSH + Kp-10 + LH (39)	0,17 ^{AB}	0,83 ^{AB}	0,79 ^B
Kp-10 (37)	0,09 ^B	0,91 ^B	0,74 ^B

Notas: Valores seguidos por letras diferentes na coluna, diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

A intensidade de fluorescência das probes MitoTracker e DCF variaram entre os tratamentos, pois os ovócitos que foram cultivados sem hormônios, apresentaram menor atividade mitocondrial e de DCF que os demais tratamentos. Bem como, quando a Kisspeptina era adicionada ao meio de maturação a condição de energia do ovócito e a intensidade de DCF ficaram menores do que aqueles tratamentos que tinham FSH e FSH + LH (Figura 4, $P < 0,0001$).

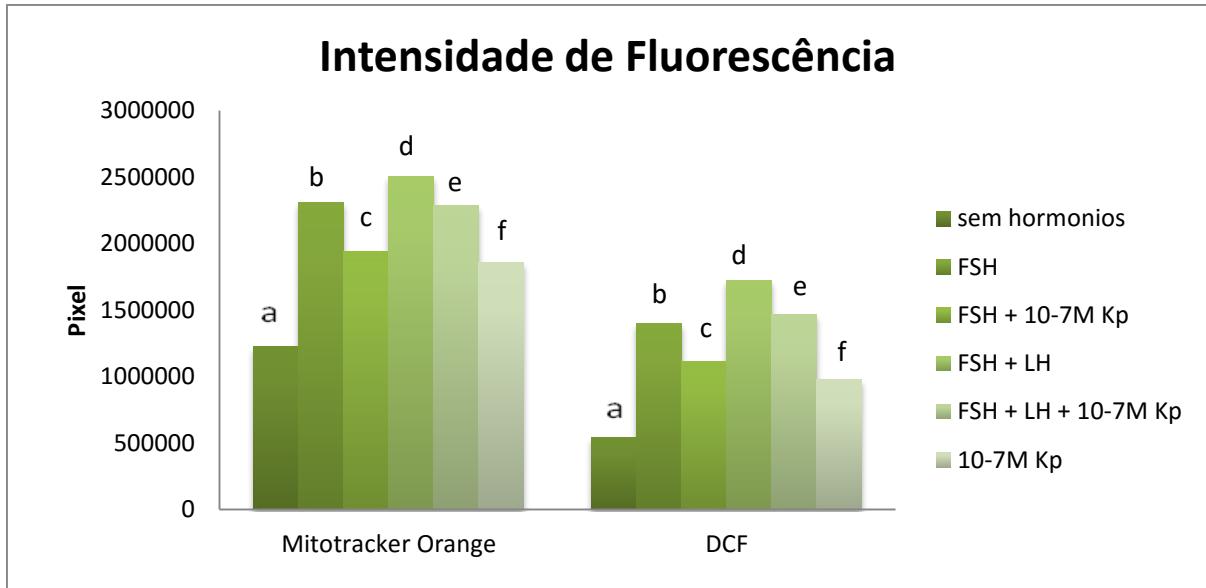


Figura 4- Intensidade de fluorescência do Mitotracker CMTMRos Orange e de DCF de ovócitos bovinos maturados *in vitro*, em diferentes meios de maturação.

5. DISCUSSÃO

Com base na evidencia que a Kisspeptina possui um efeito direto nos ovários dos animais, no presente estudo detectou-se efeitos da Kisspeptina na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos. Nos últimos anos, muitos estudos têm demonstrado que a Kisspeptina desempenha papéis importantes na fisiologia reprodutiva dos humanos e dos animais. Sua ação no eixo hipotálamo e hipófise já foi abordada por muitos pesquisadores, contudo surge a questão de seu efeito direto na foliculogênese e ovogênese. Os genes codificadores de Kiss1 e Kiss1R foram detectados em gônadas de diversas espécies (CASTELLANO et al., 2006; NOCILLADO et al., 2007; INOUE et al., 2009; GAYTÁN et al., 2009), contudo seu efeito na maturação ovocitária bovina ainda estava em aberto.

Dessa forma, ovócitos maturados apenas com FSH tiveram uma menor maturação nuclear quando comparados àqueles maturados com FSH e Kisspeptina, nas diferentes concentrações testadas. Esses achados corroboram com os resultados encontrados por Saadeldin et al. (2012) que, ao avaliarem a extrusão do corpúsculo polar de ovócitos suínos maturados com Kisspeptina, obtiveram uma melhor resposta quando a mesma era adicionada. Assim, a menor concentração de Kisspeptina (10^{-7} M) encontrada foi diferente daquela concentração utilizada por Saadeldin et al. (2012), já que os mesmos utilizaram uma quantidade dez vezes maior. Lembrando que estes pesquisadores trabalharam com ovócitos suínos, o que

leva a hipótese que os ovócitos bovinos necessitam de uma menor quantidade de Kisspeptina para uma melhor competência.

O processo de maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos devem ser interligados (MEIRELLES et al., 2004) e as mitocôndrias desempenham um papel importante nesse processo, uma vez que são a principal fonte de ATP durante a maturação do ovócito (KRISHER e BAVISTER 1998; STOJKOVIC et al., 2001). A perda da função mitocondrial e subsequente baixa produção de ATP é um dos principais fatores que comprometem a qualidade do ovócito (STOJKOVIC et al., 2001; BREVINI et al., 2005).

A reorganização mitocondrial é um importante indicador da competência ovocitária, pois está correlacionada com a produção de ATP e consequente desenvolvimento embrionário (YU et al. 2010; DUMOLLARD et al. 2006; BREVINI et al., 2005; STOJKOVIC et al., 2001;). Assim, em bovinos (SOMFAIA et al 2012), suínos (BREVINI et al.,2005) e roedores (YU et al. 2010) as mitocôndrias migram da região periférica para o centro do ovócito durante a maturação. Corroborando com o presente estudo, pois a maioria dos ovócitos se encontravam com distribuição mitocondrial difusa após a MIV.

No Experimento 1 o aumento da concentração da Kisspeptina não influenciou a distribuição e atividade mitocondrial, contudo teve efeito na quantidade de ROS encontrada, já que com o aumento da concentração do peptídeo durante a MIV levou a uma menor intensidade de fluorescência de DCF, sugerindo um efeito antioxidativo do peptídeo. Resultados semelhantes foram encontrados por Aydin et al. (2010), em que roedores tratados com Kisspeptina aumentaram seus níveis intracitoplasmáticos de superóxido dismutase (SOD) e de catalase nas células hepáticas, que são enzimas que protegem as células dos efeitos dos radicais livres, sugerindo um efeito antioxidativo do peptídeo sobre os hepatócitos.

No segundo experimento para comparar os efeitos da Kisspeptina com hormônios FSH e LH, foi utilizado a concentração de 10^{-7} M de Kisspeptina encontrada no experimento anterior, como a menor concentração capaz de resultar em melhor competência ovocitária. Nesse experimento 2 não houve diferença na maturação nuclear, quando a kisspeptina era associada aos hormônios, ou quando estava sozinha no meio de maturação. A capacidade da kisspeptina em maturar nuclearmente os ovócitos sem a presença dos outros hormônios não era esperado, já que no trabalho de Saadeldin et al. (2012), na ausência das gonadotrofinas LH e FSH, a Kisspeptina sozinha não conseguiu maturar os ovócitos, pois nenhum ovócito foi encontrado com extrusão do corpúsculo polar.

A Kisspeptina ser capaz de realizar a maturação nuclear de ovócitos bovinos pode ser explicada por várias vias de transdução, uma delas é com o aumento da produção de C-MOS,

pois essa ativa as MAPKs, bem como seu efeito direto na ativação dessas proteínas quinases. Em células cancerígenas a Kisspeptina se liga ao Kiss1R e degradada o fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP2) presente na membrana em 1,4,5 trifosfato de inositol (IP3) e 1,2 diacilglicerol (DAG), esse DAG ativa a proteína quinase C (PKC) que fosforila as MAPKs, principalmente as ERK 1 e 2, levando ao efeito antimetástaticos e antiproliferativos da kisspeptina (RINGEL et al., 2002; KOTANI et al., 2001). Lembrando que na maturação ovocitárias as principais MAPKs envolvidas são ERK 1 e 2 e são de extrema importância para a maturação ovocitária, assim a ação direta da kisspeptina nessa ativação poderia ser uma hipótese para a explicação do seu efeito durante a maturação.

Outra via de possível ação da kisspeptina seria pela ativação da PKC que também seria capaz de incrementar as concentrações de MPF, pois poderia ativar o cdc25 fosfatase, que desfosforila a treonina-14 e a tirosina-15 para ativar a p34cdc2 no processo de ativação do MPF (BERTAGNOLLI et al., 2004). O MPF é importante na condensação cromossômica e reorganização microtubular (VERDE *et al.*, 1992).

A proporção da distribuição mitocondrial foi diferente entre os tratamentos, pois ovócitos maturados com FSH e LH ou apenas Kisspeptina tiveram uma maior quantidade de ovócitos com mitocôndrias na forma difusa, quando comparamos aos tratamentos que não continham hormônios, ou que tinham apenas FSH. Contudo, a intensidade de fluorescência emitidas pelas mitocôndrias demonstraram que quando a Kisspeptina foi adicionada no meio de maturação ela interferiu na atividade mitocondrial, pois àqueles tratamentos que continham a mesma resultaram em menor atividade mitocondrial e consequentemente menor intensidade de ROS. Como o metabolismo mitocondrial é responsável pela produção de ROS (GUERIN, MOUATASSIM e MENEZO, 2001), quanto menor a atividade mitocondrial, menor será a produção de radicais livres.

Vale ressaltar que apesar dos tratamentos que continham Kisspeptina resultarem em menor atividade mitocondrial, essa ainda foi maior do que o controle negativo, uma vez que este foi o menor status de energia encontrado. Embora a Kisspeptina tenha interferido na atividade mitocondrial, isso não influenciou na maturação nuclear encontrada, dados semelhante foram encontrados por Stojkovic et al. (2001), que sugeriram que a atividade metabólica do ovócito bovino é, pelo menos em grande parte, independe da maturação nuclear, pois a quantidade de ATP do ovócitos com extrusão do corpúsculo polar não diferiu daqueles ovócitos em que a VG tinha sido removida antes da MIV.

A intensidade de fluorescência do MitoTracker dos ovócitos foi maior naqueles tratamentos que continham LH nos grupos sem e com Kisspeptina, tais resultados se

assemelham aos encontrados por Zuelke e Brackeft (1993), que ao avaliarem os efeitos do LH durante a maturação ovocitária de bovinos, observaram que os tratamentos que continham o LH resultou em um aumento na atividade glicolítica e oxidação de glicose e glutamina, sendo o meio pelo qual a gonadotrofina melhoraria a qualidade do ovócito durante a maturação.

A realização de mais estudos para melhor entender o mecanismo de ação da Kisspeptina e de seus efeitos na produção *in vitro* de embriões bovinos se faz necessária, já que a forma de atuar do peptídeo muda conforme o tipo celular.

6. CONCLUSÃO

A Kisspeptina-10 induz a maturação nuclear dos ovócitos bovinos na ausência de suplementação com gonadotrofinas, contudo diminui a atividade mitocondrial dos ovócitos e consequentemente a quantidade de ROS produzida.

REFERENCIAS

- AHMED, A. E.; SAITO, H.; SAWADA, T.; YAEGASHI, T.; SAWAI, J. J.; K.; YAMASHITA, T.; HASHIZUME, T. Sex steroid hormones do not enhance the direct stimulatory effect of kisspeptin-10 on the secretion of growth hormone from bovine anterior pituitary cell. **Animal Science Journal**. v.82, p.73–77, 2011.
- AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p.257-265, 1993.
- AMBRUOSI, B.; LACALANDRA, G.M.; IORGA, A.I.; DE SANTIS, T.; MUGNIER, S.; MATARRESE, R.; GOUDET, G.; DELL'AQUILA, M.E. Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: Implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after . **Theriogenology**, v.71, p. 1093–1104, 2009.
- ANGUITA, B.; PARAMIO, M.T.; JIMENEZ-MACEDO, A.R.; MORATÓ, R.; MOGAS, T.; IZQUIERDO, D. Total RNA and protein content, Cyclin B1 expression and developmental competence of prepubertal goat oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.103, p.290-303, 2008.
- AUSTIN, C.R.; Cortical granules in hamster eggs. **Experimental Cell Research**, v.10, p.533–540, 1956.
- AYDIN, M.; OKTAR, S; YONDEN, Z.; OZTURK, O. H.; YILMAZ, B. Direct and indirect effects of kisspeptin on liver oxidant and antioxidant systems in young male rats. **Cell Biochem Funct**, v. 28, p.293–299, 2010.
- BECKERS, J.F. DRION, P.; FIGUEIREDO, J.R.; GOFFIN, L.; PIROTTIN, D.; ECTORS, F. The ovarian follicle in cow: in vivo growth and in vitro culture. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, p.543-548, 1996.
- BERTAGNOLLI, A.C.; GONÇALVES, P.B.D.; GIOMETTI, I.C.; COSTA, L.F.S.; OLIVEIRA, J.F.C.; GONÇALVES, I.D.V.; BARRETO, K.P.; EMANUELLI, I.P.; BORGES, L.F.K. Interação entre células do cumulus e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de óocitos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.4, p.488-496, 2004.
- BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C.; STUBBING, R. B., XU, K.P.; KING, W. A. Potencial genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.87-98, 1989.
- BRAW-TAL, R. YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **The Journal of the Society for Reproduction and Fertility**, v.109, p.165-171, 1997.
- BREVINI, T.A.L.; FRANCISCI, R.V. C.; GANDOLFI, F. Role of Adenosine Triphosphate, Active Mitochondria, and Microtubules in the Acquisition of Developmental Competence of Parthenogenetically Activated Pig Oocytes . **Biology of Reproduction**, v.72, p.1218–1223, 2005.

CALDER, M.; CHAN, Y.M.; RAJ, R.; PAMPILLO, M.; ELBERT, A.; NOONAN, M.; GILLIO-MEINA, C.; CALIGIONI, C.; BÉRUBÉ, N.G.; BHATTACHARYA, M.; WATSON, A.J.; SEMINARA, S.B.; BABWAH, A.V. Implantation failure in female Kiss1-/- mice is independent of their hypogonadic state and can be partially rescued by leukemia inhibitory factor. **Endocrinology**, v.155, p.3065–3078, 2014.

CARATY, A.; SMITH, J.T.; LOMET, D.; BEN SAID, S.; MORRISSEY, A.; COGNIE, J.; DOUGHTON, B.; BARIL, G.; BRIANT, C.; CLARKE, I.J. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. **Endocrinology**, v.148, p.5258–67, 2007.

CASTELLANO, J.M.; GAYTAN, M.; ROA, J.; VIGO, E.; NAVARRO, V. M.; BELLIDO, C.; DIEGUEZ, C.; AGUILAR, E.; SÁNCHEZ-CRIADO, J. E.; PELLICER, A.; PINILLA, L.; GAYTAN, F.; TENA-SEMPERE, M. Expression of KiSS-1 in rat ovary: Putative local regulator of ovulation? **Endocrinology**, v.147, p.4852–4862, 2006.

CLARKSON, J.; HERBISON, A.E. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropinreleasing hormone neurons. **Endocrinology**, v.147, p.5817–5825, 2006.

CLARKSON, J. D'ANGLEMONT DE TASSIGNY, X.; COLLEDGE, W.H.; CARATY, A.; HERBISON, A.E. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. **Journal of Neuroendocrinology**, v.21, p.673–682, 2009.

COELHO, L.A.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; VANTINI, R.; SILVA FILHO, I.R.; ALMEIDA Jr., I.L. Avaliação das condições de maturação oocitária e do efeito do reprodutor na produção in vitro de embriões bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary. Research and. Animal. Science**, v. 35, p. 120-122, 1998.

COMPORI, M. Three models of free radical induced cell injury. **Chemistry and Biology Interact**, v.72, p.1-56, 1989.

CROCOMO, L. F.; MARQUES FILHO, W. C.; SUDANO, M. J.; PASCHOAL, D. M.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; BICUDO, S. D. Effect of roscovitine and cycloheximide on ultrastructure of sheep oocytes. **Small Ruminant Research**. v.109, p.156-162, 2013.

DADARWAL, D.; ADAMS, G. P.; HYTTEL, P.; BROGLIATTI, G. M.; CALDWELL, S.; SINGH, J. Organelle reorganization in bovine oocytes during dominant follicle growth and regression. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.13, p.124, 2015.

DAI, Y.; LEE, C.; HUTCHINGS, A.; SUN, Y.; MOOR, R. Selective requirement for cdc25c protein synthesis during meiotic progression in porcine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.62, p.519-532, 2000.

DEDIEU, T.; GALI, L.; CROZET, N.; SEVELLEC, C.; RUFFINI, S. Mitogen- activated protein kinase during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. **Molecular Reproduction and Development**, v.45, p.351-358, 1996.

DE ROUX, N.; GENIN, E.; CAREL, J.C.; MATSUDA, F.; CHAUSSAIN, J.L.; MILGROM, E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide

receptor GPR54. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, p.10972–10976, 2003.

DODE, M.A.; RODOVALHO, N.C.; UENO, V.G.; ALVES, G.O. Efeito do tamanho do folículo na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de fêmeas zebuínas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.1, p.207-2014, 2000.

DUMOLLARD, R.; DUCHEN, M.; SARDET, C. Calcium signals and mitochondria at fertilisation. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v.17, p.314–323, 2006.

FAIR, T.; HULSHOF, S.C.J.; HYTTEL, P.; BOLAND, M.; GREVE, T. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to tertiary follicles. **Anatomy and Embryology**, v.195, p.327-336, 1997.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V.; Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais - MOIFOPA. In: Gonçalves, P. B. D; Figueiredo, J. R.; Freitas, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed., Roca: São Paulo, 2008. pp.303-327.

FRANCESCHINI, I.; LOMET, D.; CATEAU, M.; DELSOL, G.; TILLET, Y.; CARATY, A. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. **Neuroscience Letters**, v.401, p. 225–230, 2006.

FUJIMOTO, T.; YUKIHIRO, M.; MASATOSHI, F. The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. **Anatomical Record**, v.188, p.315-330, 1977.

FUNES, S.; HEDRICK, J.A.; VASSILEVA, G.; MARKOWITZ, L.; ABBONDANZO, S.; GOLOVKO, A.; YANG, S.; MONSMA, F.J.; GUSTAFSON, E.L. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 312, p.1357–1363, 2003.

GAYTÁN, M.; CASTELLANO, J.M.; ROA, J.; SÁNCHEZ-CRIADO, J.E.; TENA-SEMPERE, M.; GAYTAN, F. Expression of KiSS-1 in rat oviduct: Possible involvement in prevention of ectopic implantation? **Cell and Tissue Research**, v.329, p.571–579. 2007.

GAYTÁN, F.; GAYTÁN, M.; CASTELLANO, J.M.; ROMERO, M.; ROA, J.; APARICIO, B.; GARRIDO, N.; SÁNCHEZ-CRIADO, J.E.; MILLAR, R.P.; PELLICER, A.; FRASER, H.M.; TENA-SEMPERE, M. KiSS-1 in the mammalian ovary: Distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. **American Journal Physiology Endocrinology Metabolism**, v.296, p.E520–E531, 2009.

GIBBONS, J.R.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1066-1073, 1997.

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

GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.61-79, 2000.

GORDON, I. Prenatal Development of the Bovine Ovary. In: Gordon, I. Laboratory production of cattle embryos. Cambridge: CAB International: **New York, Raven Press**, P; 4349, 1994.

GORDO, A.C.; HE, C.L.; SMITH, S.; FISSORE, R. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, p.106-114, 2001.

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.82-94, 2009.

GOTTSCH, M.L.; CUNNINGHAM, M.J.; SMITH, J.T.; POPA, S.M.; ACOHIDO, B.V.; CROWLEY, W.F.; SEMINARA, S.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. **Endocrinology**, v.145, p.4073-4077, 2004.

GU, G.B.; SIMERLY, R.B. Projections of the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus in the female rat. **Journal of Comparative Neurology**, v.384, p.142-164, 1997.

GUERMRA, S.; MONZANI, P.S.; SANTOS, E.S.; ZANIN, R.; OHASHI, O.M.; MIRANDA, M.S.; ADONA, P.R. Maturação in vitro de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, p.1616-1624, 2013.

GUERIN, P.; MOUATASSIM, S.E.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, p.175-189, 2001.

GULYAS, B. J.; Cortical granules of mammalian eggs. **International Review Cytology**, v.63, p.357-392, 1980.

GUTIÉRREZ-PASCUAL, E.; MARTÍNEZ-FUENTES, A.J.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M.; MALAGÓN, M.M.; CASTAÑO, J.P. Direct pituitary effects of kisspeptin: Activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. **Journal of Neuroendocrinology**, v.19, p.521-530, 2007.

HALEY, S.A.; WESSEL, G.M. Regulated proteolysis by cortical granule serine protease 1 at fertilization. **Molecular and Cellular Biology**, v.15, p.2084-2092, 2004.

HAMEED, S.; JAYASENA, C.N.; DHILLO, W.S.; Kisspeptin and fertility. **Journal of Endocrinology**, v.208 (2), p.97-105, 2011.

HIDEN, U.; BILBAN, M.; KNÖFLER, M.; DESOYE, G. Kisspeptins and the placenta: regulation of trophoblast invasion. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v.8, p.31-39, 2007.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovarian. **International Review of Citology**, v. 124, p. 43-101, 1991.

HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote**, v.5, p.371-376, 1997.

INOUE, N.; HIRANO, T.; UENOYAMA, Y.; TSUKAMURA, X.; OKAMURA, H.; Maeda, K. Localization of kisspeptin and gonadotrophinreleasing hormone (GnRH) in developing ovarian follicles of pigs and goats. **Biology of Reproduction**, v.81, p.551, 2009. [Abstract]

IRELAND, J. J. Control of follicular growth and development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.34, p.39-54, 1987.

IRELAND, J.J.; MIHM, M.; AUSTIN, E.; DISKIN, M.G.; ROCHE, J.F. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: Key concepts, studies, advancements, and terms. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1648-1658, 2000.

JOSEFSBERG, L.B.; GALIANI, D.; LAZAR, S.; KAUFMAN, O.; SEGER, R.; DEKEL, N. MPF governs MAPK activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 68, p.1282-1290, 2003.

KLINKE, D. Attributes and dynamics of the endoplasmic reticulum in mammalian eggs. **Current Topics in Development Biology**, v.50, p.125-154, 2000.

KOTANI, M.; DETHEUX, M.; VANDENBOGAERDE, A.; COMMUNI, D.; VANDERWINDEN, J.M.; LE POUL, E.; BREZILLON, S.; TYLDESLEY, R.; SUAREZ-HUERTA, N; VANDEPUT, F.; BLANPAIN, C.; SCHIFFMANN, S.N.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.34631–34636, 2001.

KRISHER, R.L.; BAVISTER, B.D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v.49, p.103-114,1998.

LANDIM-ALVARENGA, F. C.; CHOI, Y. H. *In vitro* maturation of equine oocytes without hormones. **Theriogenology**. v.51, p.383, 1999.

LEE, J.H.; MIELE, M.E.; HICKS, D.J; PHILLIPS, K.K.; TRENT, J.M.; WEISSMAN, B.E.; WELCH, D.R. KiSS-1, a Novel Human Malignant Melanoma Metastasis-Suppressor . **Journal of the National Cancer Institute**. v.88(23), p.1731-1737,1996.

LEE; D.K.; NGUYEN, T.; O'NEILL, G.P.; CHENG, R.; LIU, Y.; HOWARD, A.D.; COULOMBE, N.; TAN, C.P.; TANG-NGUYEN, A.T.; GEORGE, S.R.; O'DOWD, B.F. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. **FEBS Letts**, v. 446, p.103–107, 1999.

LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; ROBERTS, T.H.; HIRSHBERG,K. Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.16, p.557-589, 2000.

LUSSIER, J. G.; MATTON, P.; DUFOUR, J. J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, p. 301- 307, 1987.

MACHACA, K. Ca²⁺ signaling differentiation during oocyte maturation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, p.331–340, 2007.

MAO, L.; LOU, H.; LOU, Y.; WANG, N.; JIN, F. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. **Reproductive BioMedicine Online**. v.28, p.284-299, 2014.

MARTINO, N.A.; RIZZO, A.; PIZZI, F.; DELL'AQUILA , M.E.; SCIORSI, R.L. Effects of kisspeptin-10 on in vitro proliferation and kisspeptin receptor expression in primary epithelial cell cultures isolated from bovine placental cotyledons of fetuses at the first trimester of pregnancy. **Theriogenology**, v.83, p.978–987, 2015.

MASTRIOANNI Jr, L.; JONES, R. Oxygen tensions in the rabbit fallopian tube. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.9, p.99-102, 1965.

MASUI, T.; DOI, R.; MORI, T.; TOYODA, E.; KOIZUMI, M.; KAMI, K.; ITO, D.; PEIPER, S.C.; BROACH, J.R.; OISHI, S.; NIIDA, A.; FUJII, N.; IMAMURA, M. Metastin and its variant forms suppress migration of pancreatic cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.315, p.85–92, 2004.

MCNATTY, K. P.; JUENGEL, J. L.; READER, K. L.; LUN, S.; MYLLYMAA, S.; LAWRENCE, S. B.; WESTERN, A.; MEERASAHI, M. F.; MOTTERSHEAD, D. G.; GROOME, N. P.; RITVOS, O.; Laitinen, M. P. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. **Reproduction**, v. 129, p. 481–487, 2005.

MEIRELLES, F.V; CAETANO, A.R.; WATANABE, Y.F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S.F.; MERIGHE, G.K.; GARCIA, S.M; Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.13-20, 2004.

MERKLEY, C. M., PORTER, K.L.; COOLEN, L.M.; HILEMAN, S.M.; BILLINGS, H.J.; DREWS, S.; GOODMAN, R.L.; LEHMAN, M.N. KNDy (kisspeptin/neurokinin B/dynorphin) neurons are activated during both pulsatile and surge secretion of LH in the ewe. **Endocrinology**, v.153, p.5406–5414, 2012.

MESSAGER, S.; CHATZIDAKE, E.E.; MA, D.; HENDRICK, A.G.; ZAHN, D.; DIXON, J.; THRESHER, R.R.; MALINGE, I.; LOMET, D.; CARLTON, M.B.L.; COLLEDGE, W.H. CARATY, A.; APARICIO, S.A. J. R. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, p.1761–1766, 2005.

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

MORENO, R.D.; SCHATTEN, G.; RAMALHO-SANTOS, J. Golgi apparatus dynamics during mouse oocyte in vitro maturation: effect of the membrane trafficking inhibitor brefeldin A. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1259-1266, 2002.

MOTTA, P.M.; MAKABE, S. Germ cells in the ovarian surface during fetal development in humans. A three dimensional microanatomical study by scanning and transmission electron microscopy. **Journal of submicroscopic cytology and pathology**, v.81, p.271-276, 1986.

MUIR, A.I.; CHAMBERLAIN, L.; ELSHOURBAGY, N.A.; MICHALOVICH, D.; MOORE, D.J.; CALAMARI, A.; SZEKERES, P.G.; SARAU, H.M.; CHAMBERS, J.K.; MURDOCK, P.; STEPLEWSKI, K.; SHABON, U.; MILLER, J.E.; MIDDLETON, S.E.; DARKER, J.G.; LARMINIE, C.G.; WILSON, S.; BERGSMA, D.J.; EMSON, P.; FAULL, R.; PHILPOTT, K.L.; HARRISON, D.C. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.28969-28975, 2001.

NAVARRO, V.M.; CASTELLANO, J.M.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R.; TOVAR, S.; ROA, J.; MAYEN, A.; BARREIRO, M. L.; CASANUEVA, F. F.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE M. Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. **Endocrinology**, v.146, p.1689-1697, 2005.

NAVENOT, J.M.; WANG, Z.; CHOPIN, M.; FUJII, N.; PEIPER, S.C. Kisspeptin-10-induced signaling of GPR54 negatively regulates chemotactic responses mediated by CXCR4: a potential mechanism for the metastasis suppressor activity of kisspeptins. **The Journal of Cancer Research**, v.65, p.10450-6, 2005.

NOCILLADO, J. N.; LEVAVI-SIVAN, B.; CARRICK, F.; ELIZUR, A. Temporal expression of G-protein-coupled receptor 54 (GPR54), gonadotrophin-releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (drd2) in pubertal female grey mullet, Mugil cephalus. **General and Comparative Endocrinology**, v.150, p.278-287, 2007.

OHTAKI, T.; SHINTANI, Y.; HONDA, S.; MATSUMOTO, H.; HORI, A.; KANEHASHI, K.; TERAO, Y.; KUMANO, S.; TAKATSU, Y.; MASUDA, Y.; ISHIBASHI, Y.; WATANABE, T.; ASADA, M.; YAMADA, T.; SUENAGA, M.; KITADA, C.; USUKI, S.; KUROKAWA, T.; ONDA, H.; NISHIMURA, O.; FUJINO, M. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. **Nature**, v.411, p.613-617, 2001.

OLIVEIRA, M.E.F.; FERREIRA, R.M.; MINGOTI, G.Z. Controle do crescimento e da seleção folicular por fatores locais e sistêmicos na espécie bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.4, p.418-432, 2011.

PAYNE, C.; SCHATTEN, G. Golgi dynamics during meiosis are distinct from mitosis and are coupled to endoplasmic reticulum dynamics until fertilization. **Developmental Biology**, v.264, p.50-63, 2003.

PENG, J.; LI, Q.; WIGGLESWORTH, K.; RANGARAJAN, A.; KATTAMURI, C.; PETERSON, R. T. MATZUK, M. M. Growth differentiation factor 9:bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, v. 110, p.E776–E785, 2013.

PETERS, H. Migration of gonocytes in to mammalian gonad and their differentiation. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, , v.259, p.91-101, 1970.

PIELECKA-FORTUNA, J.; CHU, Z.; MOENTER, S.M. Kisspeptin Acts Directly and Indirectly to Increase Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Activity and Its Effects Are Modulated by Estradiol. **Endocrinology**, v.149, p.1979-1986, 2008.

PINCUS, G.; ENZMANN, E. The comparative behavior of mammalian eggs *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of Experimental Medicine**. v.62, p.665-675, 1935.

POSADA, J.; COOPER, J.A. Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in *Xenopus* oocytes. **Science**, v.255, p.212-215, 1992.

RINGEL, M.D.; HARDY, E.; BERNET, V.J; BURCH, H.B.; SCHUPPERT, F.; BURMAN, K.D.; SAJI, M. Metastin receptor is overexpressed in papillary thyroid cancer and activates MAP kinase in thyroid cancer cells. **The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v.87, p. 2399, 2002.

ROA, J.; TENA-SEMPERE, M. KISS-1 system and reproduction: comparative aspects and roles in the control of female gonadotropic axis in mammals. **General and Comparative Endocrinology**, v.153(1-3), p.132-40, 2007.

ROSEWEIR, A.K.; KAUFFMAN, A.S.; SMITH, J.T.; GUERRERO, K.A.; MORGAN, K.; PIELECKA- FORTUNA, J.; PINEDA, R.; GOTTSCH, M. L.; TENA-SEMPERE, M.; MOENTER, S.M.; TERASAWA, E.; CLARKE, I.J. STEINER, R.A. MILLAR, R.P.; Discovery of a potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. **Journal of Neuroscience**, v.29, p.3920–3929, 2009.

ROSEWEIR, A.K.; KATZ, A.A.; MILLAR, R.P. Kisspeptin-10 inhibits cell migration in vitro via a receptor-GSK3 beta-FAK feedback loop in HTR8SVneo cells. **Placenta**, v.33, p.408–415, 2012.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatômica**, v.24, p.77-92, 1983. SAADELDIN, I.M.; KOO, O.J.; KANG, J.T.; KWON, D.K.; PARK, S.J.; KIM, S.J.; MOON, J.H.; OH, H.J.; JANG, G.; LEE, B.C. Paradoxical effects of kisspeptin: it enhances oocyte in vitro maturation but has an adverse impact on hatched blastocysts during in vitro culture. **Reproduction, Fertility and Development**, v.24(5), p.656-668, 2012.

SAUMANDE, J. La folliculogenèse chez les ruminants. **Recueil de Médecine. Vétérinaire**, v. 167, p. 205-218, 1991.

SEMINARA, S.B.; MESSAGER, S.; CHATZIDAKI, E.E.; THRESHER, R.R.; ACIERNO, J.S.; JR. SHAGOURY, J.K.; BO-ABBAS, Y.; KUOHUNG, W.; SCHWINOF, K.M.; HENDRICK, A.G.; ZAHN, D.; DIXON, J.; KAISER, U.B.; SLAUGENHAUPT, S.A.; GUSELLA, J.F.; O'RAHILLY, S.; CARLTON, M.B.; CROWLEY, W.F.; JR. APARICIO,

S.A.; COLLEDGE, W.H. The GPR54 gene as a regulator of puberty. **The New England Journal of Medicine**, v.349, p. 1614–1627, 2003.

SILVA, C.; CALEGARI, R.S.; MARTINS JUNIOR, A. Desenvolvimento de embriões bovinos após maturação in vitro de oócitos em meio de cultivo suplementado com taurina ou glicina. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, p.89-100, 2009.

SILVA, J.R.V.; FERREIRA, M.A.L.; COSTA, S. H. F.; SANTOS, R. R.; CARVALHO, F. C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. **Small Ruminant Research**, v. 43, p.203-209, 2002.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**. v.55, p.1241-1254, 2001.

SMITH, J.T., CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. **Reproduction**, v.131, p.623–630, 2006.

SMITH, J.T.; CUNNINGHAM, M.J.; RISSMAN, E.F.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. **Endocrinology**, v.146, p.3686–92, 2005.

SMITH, J.T.; CLAY, C.M.; CARATY, A.; CLARKE, I.J. KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. **Endocrinology**, v.148, p.1150–1157, 2007.

SMITH, J.T.; RAO, A.; PEREIRA, A.; CARATY, A.; MILLAR, R.P.; CLARKE, I.J. Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin in vivo. **Endocrinology**. v.149, p.1951–1959, 2008.

SOMFAIA, T.; INABAA, Y.; WATANABEA, S.; GESHIA, M.; NAGAI, T. Follicular fluid supplementation during in vitro maturation promotes sperm penetration in bovine oocytes by enhancing cumulus expansion and increasing mitochondrial activity in oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v.24, p.743–752, 2012.

STAFFORD, L.J.; XIA, C, MA, W.; CAI, Y.; LIU, M. Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor KiSS1 and its G protein-coupled receptor. **Cancer Research**, v.62 , p.5399–5404, 2002.

STOJKOVIC, M. ;MACHADO, S.A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONCALVES, P.B.;WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of reproduction**. 64, 904–909, 2001.

SUN, Q.Y.; WU, G.M.; LAI, L.; PARK, K.W.; CABOT, R.; CHEONG, H.T.; DAY, B.N.; PRATHER, R.S.; SCHATTEN, H. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. **Reproduction**, v.122, p.155–163, 2001.

- SUZUKI, S.; KADOKAWA, H.; HASHIZUME, T. Direct kisspeptin-10 stimulation on luteinizing hormone secretion from bovine and porcine anterior pituitary cells. **Animal Reproduction Science**, v.103, p.360–365, 2008.
- TERAO, Y.; KUMANO, S.; TAKATSU, Y.; HATTORI, M.; NISHIMURA, A.; OHTAKI, T.; SHINTANI, Y. Expression of KiSS-1, a metastasis suppressor gene, in trophoblast giant cells of the rat placenta. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1678, p.102–110, 2004.
- TOMIKAWA, J.; HOMMA, T.; TAJIMA, S.; SHIBATA, T.; INAMOTO, Y.; TAKASE, K.; INOUE, N.; OHKURA, S., UENOYAMA, Y.; MAEDA, K.; TSUKAMURA, H. Molecular characterization and estrogen regulation of hypothalamic KISS1 gene in the pig. **Biology of Reproduction**, v.82, p.313–319, 2010.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, n.6, p.1717–1751, 2005.
- VERDE, F.; DOGTEROM, M.; STELZER, E.; KARSENTI, E.; LEIBLER, S. Control of microtubule dynamics and lenght by cyclin A-dependent and cyclin B-dependent kinases in Xenopus eggs extracts. **The Journal of Cell Biology**. v.118, p.1097-1108, 1992.
- VERLHAC, M.H.; PENNART, H.D.; MARO, B.; COBB, M.H.; CLARKE, H.J. MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. **Developmental Biology**, v.158, p.330-340, 1993.
- WESSEL, G.M.; BROOKS, J.M.; GREEN, E.; HALEY, S.; VORONINA, E.; WONG, J.; ZAYDFUDIM, V.; CONNER, S. The biology of cortical granules. **International Review Cytology**, v.209, p.117-206, 2001.
- WHITLOCK, B.K.; DANIEL, J.A.; WILBORN, R.R.; MAXWELL, H.S.; STEELE, B.P.; SARTIN, J.L. Effect of kisspeptin on regulation of growth hormone and luteinizing hormone in lactating dairy cows. **Journal Animal Sci Biotech.**; v.2, p.131–140, 2011.
- WITHAM, E.A; MEADOWS, J.D.; HOFFMANN, H.M.; SHOJAEI, S.; COSS,D.; KAUFFMAN, A.S.; MELLON, P.L. Kisspeptin regulates gonadotropin genes via immediate early gene induction in pituitary gonadotropes. **Molecular Endocrinology** v.27, p.1283–1294, 2013.
- YU, Y.; DUMOLLARD, R.; ROSSBACH, A.; LAI, F.A.; SWANN, K. Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. **Journal of Cellular Physiology**, v.224, p. 672–680, 2010.
- ZHANG, M.; OUYANG, H.; XIA, G. The signal pathway of godadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, p. 399-409, 2009.
- ZHANG, P.; TANG, M.; ZHONG, T.; LIN, Y.; ZONG, T.; ZHONG, C.; ZHANG, B.; REN, M.; KUANG, H. Expression and function of kisspeptin during mouse decidualization. **PloS One**, v.9, e97647, 2014.

ZUELKE, K.A.; BRACKEFT, B.G. Increased Glutamine Metabolism in Bovine Cumulus Cell-Enclosed and Denuded Oocytes after In Vitro Maturation with Luteinizing Hormone. **Biology of Reproduction**, v.48, p.815-820, 1993.

ANEXOS

Anexo A: Meios utilizados na Maturação *in vitro* de ovócitos bovinos

Antibiótico

Diluir o sulfato de amicacina (1.0370.0297) em água . Diluir 1 ml da solução de sulfato de amicacina em 14 ml de água.

Solução de piruvato

A solução de piruvato dever ser feita todos os dias. Pesar 0,0055 g de Piruvato sódico e diluir em 500 μ L de água Milli Q.

Meio de lavagem de ovócitos

Componentes	Meio de Lavagem	Código do Produto
TCM 199 HEPES	9mL	Sigma – M7528
SFB	1mL	Cultilab
Amicacina	50 μ L	Teuto-1.0370.0297
Piruvato	20 μ L	Sigma – P2256

FSH (Folltropin) (0,5 μ g/ μ L)

Solução mãe = Diluir conteúdo de um frasco (400 mg) em 80 mL de TCM Bicarbonato (Base de maturação).

Diluir 500 μ L da solução mãe em 4,5 mL de TCM Bicarbonato e fazer alíquotas de 100 μ L

LH (Lutropin) (5 μ g/ μ L)

Solução mãe = Diluir o conteúdo do frasco (25 mg) em 5 mL de TCM Bicarbonato (Base de maturação).

Diluir 1 mL em 9mL de TCM e fazer alíquotas de 110 μ L.

Kispeptina-10 (46,34 µg/mL)

Diluir 10 µL em 10 mL de solução salina/ TCM 199-Bicarbonato.

Base TCM 199 bicarbonato

Componentes	Base	Código do Produto
Água Milli-Q	10 mL	Feita no laboratório
TCM 199	0,095 g	Sigma – M0393
Bicarbonato de Sódio (26mM)	0,022 g	Sigma – S5761

Meio de maturação de ovócitos

Componentes	Meio de maturação	Código do Produto
Base TCM 199 Bicarbonato	9 mL	Feito no laboratório
SFB	1 mL	Gibco - 12657029
Gentamicina	50 µL	Sigma – G1264
Piruvato	20 µL	Sigma – P5280
LH	100 µL	Lutropin (LH-P)
FSH	10 µL	Folltropin (FSH-P)
Kp-10	5,6 µL	345698 - American Peptide