

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

NATÁLIA CRISTINA SOSSAI ARLE

**LOCALIZAÇÃO DE RECEPTORES DE BETA-NGF (P75 E TRK) EM CÉLULAS
DO CÚMULO E OVÓCITOS IMATUROS BOVINOS E SUA ESTIMULAÇÃO COM
BETA-NGF DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO***

Uberlândia – MG

2019

NATÁLIA CRISTINA SOSSAI ARLE

**LOCALIZAÇÃO DE RECEPTORES DE BETA-NGF (P75 E TRK) EM
CÉLULAS DO CÚMULO E OVÓCITOS IMATUROS BOVINOS E SUA
ESTIMULAÇÃO COM BETA-NGF DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO***

Trabalho de Conclusão de Curso
II, encaminhado ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito para
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Co-orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Uberlândia – MG

2019

**LOCALIZAÇÃO DE RECEPTORES DE BETA-NGF (P75 E TRK) EM
CÉLULAS DO CÚMULO E OVÓCITOS IMATUROS BOVINOS E SUA
ESTIMULAÇÃO COM BETA-NGF DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO***

Trabalho de Conclusão de Curso
II, encaminhado ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito para
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Uberlândia, 24 de Janeiro de 2020.

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Me. Luisa Miglio

Me. Marcos Paulo Oliveira Almeida

*“¿Pies, para qué los quiero
si tengo alas pa’ volar?”
(Frida Kahlo, 1953)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento que tornou a execução deste projeto possível.

Agradeço ao Prof. Dr. José Roberto Mineo e à Prof^a Dr^a Renata Zanon pela demonstração de apoio entre cientistas em um momento tão desfavorável à ciência neste país.

Agradeço à toda a equipe do Laboratório de Biologia da Reprodução: Ana Luíza, Arthur, Danniela, Gabriel, Heitor, João Felipe, Leonardo, Rafaela, Vitória e Wytter, por cada vidraria lavada e autoclavada, ida ao frigorífico e aspiração. Um projeto nunca é totalmente realizado apenas por duas mãos, e espero poder ter lhes ensinado metade do que me ajudaram.

Agradeço especialmente ao Lucas, Muller e Paulo, que realizam outras partes deste mesmo projeto, pois eu não poderia pedir por pessoas melhores e mais dispostas a ajudar que vocês. Obrigada por todas as vezes que me socorreram. E ao Gabriel, por toda a confiança ao me ensinar a fazer PIVE.

Agradeço à uma banca incrível, Me. Luisa Miglio e Me. Marcos Paulo, que se dispuseram a participar disso comigo em pleno final de janeiro, e que corrigiram meu trabalho com um carinho tão grande, como se fosse deles.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti por ter me ensinado o real significado de se fazer pesquisa científica, por todas as correções e paciência, e peço desculpas pelos erros cometidos.

Agradeço a toda minha família, principalmente aos meu pais, Adimir e Samara, e à minha irmã, Beatriz, por acreditarem mais em mim que eu mesma, e por terem sido fortes, junto comigo, maiores que a maior dificuldade durante meu período de graduação: a saudade.

Agradeço ao meu namorado Raphael, por todo o amor e companheirismo, que são os sentimentos que me movem.

Agradeço a quem eu era ontem, por ter se permitido se tornar quem sou hoje.

A todos, minha eterna gratidão!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração representativa do desenvolvimento folicular até o momento da ovulação. Fonte: adaptado de MD.Saúde (https://www.mdsaude.com).	16
Figura 2: Ilustração representativa do folículo pré-ovulatório, contendo em seu interior o CCO. Fonte: adaptado de https://seikienokawa.wordpress.com/page/3/	18
Figura 3: Ovócitos utilizados nas PIVEs, classificados como grau I (A e B) e grau II (C e D) segundo Stojkovic (2001). Fonte: autoria própria.	23
Figura 4: Ovócitos maturados, após serem mantidos por 22h em meio de maturação. Fonte: autoria própria.....	24
Figura 5: Placa de poliestireno de 60 x 15 mm, com gotas de 100 µL de meio TALP-Fert cobertas com óleo mineral.....	26
Figura 6: A: embriões clivados no dia 2 (seta); B: blastocistos expandidos e eclodidos no dia 7 (seta). Fonte: autoria própria.....	27
Figura 7: Ovócito imaturo e células do cúmulo. Marcação de receptores p75 (A), marcação de núcleos com Yo-Pro-1 Iodide (B) e sobreposição de ambos (C)	30
Figura 8: Células do cúmulo de ovócito imaturo. Marcação de receptores p75 (A), marcação de núcleos com Yo-Pro-1 Iodide (B) e sobreposição de ambos (C)	30
Figura 9: Ovócito imaturo e células do cúmulo. Marcação de receptores Trk (A), marcação de núcleos com Yo-Pro-1 Iodide (B) e sobreposição de ambos (C)	31
Figura 10: Células do cúmulo de ovócito imaturo. Marcação de receptores Trk (A), marcação de núcleos com Yo-Pro-1 Iodide (B) e sobreposição de ambos (C)	31
Figura 11: Representação ilustrativa das projeções transzonais (TZP) entre ovócito e células da granulosa (cúmulo) e suas respectivas junções GAP e aderentes. Fonte: LIMA et al. (2016).....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dinâmica da produção in vitro de embriões bovinos, onde todo dia 0 é onde ocorre a fertilização in vitro (FIV).....	22
Tabela 2: Número de ovócitos imaturos, embriões clivados e blastocistos, nos grupos suplementado (S) e controle (C), em cada uma das rotinas.....	29
Tabela 3: Taxas de clivagem e de blastocistos obtidas em cada rotina de PIVE com meio suplementado com Beta-NGF e não suplementado e valor de p obtido na comparação dos grupos utilizando-se o teste T pareado.	29

LISTA DE ABREVIACÕES

BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BSA	Albumina sérica bovina
CCO	Complexo cúmulo ovócito
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
E2	Estradiol
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
LH	Hormônio luteinizante
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
NGF	Fator de crescimento neuronal
NT	Neurotrofina
OIF	Indução de ovulação
OPU	Aspiração folicular
P4	Progesterona
p75	Receptor de baixa afinidade de Beta-NGF
PBS	Tampão fosfato-salino
PGF2a	Prostaglandina
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
SFB	Soro fetal bovino
SOF	Synthetic oviductal fluid
TALP	Tyrode-albumina-lactato-piruvato
TCM	Tissue culture medium 199
TE	Transferência de embriões
Trk	Receptor de tirosina quinase
TrkA	Receptor de alta afinidade de Beta-NGF
TZP	Projeções transzonais
ZP	Zona Pelúcida

SUMÁRIO

RESUMO	10
1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO	14
2.1 Ciclo estral bovino	14
2.2 Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	17
2.3 Proteína Beta-NGF.....	19
3. JUSTIFICATIVA	20
4. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo geral.....	21
3.2. Objetivos específicos	21
5. MATERIAL E MÉTODOS	21
5.1 Suplementação com Beta-NGF durante a maturação	21
5.1.1 Dinâmica da produção <i>in vitro</i> de embriões	21
5.1.2 Ovócitos e sêmen	22
5.1.3 Fixação dos ovócitos imaturos.....	23
5.1.4 Maturação <i>in vitro</i> dos ovócitos.....	23
5.1.5 Fertilização <i>in vitro</i>	24
5.1.6 Cultivo <i>in vitro</i>	26
5.1.7 Análise estatística das FIVs	27
5.2 Imunofluorescência para identificação dos receptores p75 e Trk.....	27
6. RESULTADOS	28
6.1 Suplementação com Beta-NGF no meio de maturação <i>in vitro</i> favorece as taxas de clivagem e blastocistos.....	28
6.2 Ovócitos imaturos e células do cúmulo expressam ambos receptores de Beta-NGF (p75 e Trk)	29
7. DISCUSSÃO	31
8. CONCLUSÃO.....	35
9. REFERÊNCIAS.....	36

RESUMO

O uso de biotecnologias tem se tornado cada vez mais frequente como modo de aumentar a eficiência da bovinocultura no Brasil. Uma das principais técnicas, a produção *in vitro* de embriões (PIVE), possibilita a produção de um número maior de bezerros por vaca de alto potencial genético em um menor período de tempo. Entretanto, por ser um processo de alto custo, pesquisas buscam meios de aumentar sua eficiência. Já foi identificado que a proteína Beta-NGF purificada do plasma seminal de mamíferos, quando administrada para fêmeas durante a inseminação, melhora a função do corpo lúteo. Do mesmo modo, também foi verificada uma correlação positiva entre a quantidade de Beta-NGF nos espermatozoides e as taxas de clivagem e blastocisto na produção *in vitro* de embriões, indicando possível atuação durante o desenvolvimento embrionário inicial. Objetivou-se com este estudo identificar receptores de Beta-NGF (p75 e Trk) nos ovócitos imaturos bovinos e suas células do cúmulo e verificar o efeito da suplementação com Beta-NGF do meio de maturação ovocitária em rotinas de produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE). Complexos cúmulo ovócito (COC) foram marcados por imunofluorescência indireta para receptores p75 e TrK e avaliados em microscopia confocal de varredura a laser. Também foram realizadas quatro rotinas de PIVEs, onde parte dos ovócitos foram maturados com meio suplementado com Beta-NGF e parte com meio não suplementado. Ambos os receptores foram localizados nos ovócitos e nas células do cúmulo. As PIVEs onde foi utilizado meio de maturação ovocitária suplementada com Beta-NGF tiveram melhores taxas de clivagem e de formação de blastocistos (teste t pareado, $p < 0,05$). Assim, ficou demonstrado que Beta-NGF atua tanto nos ovócitos como nas células granulosas, por meio de ambos os receptores, p75 e TrK, e que a suplementação do meio de maturação com Beta-NGF é uma alternativa para melhorar os resultados de PIVEs bovinas.

Palavras-chave: Beta-NGF, p75, Trk, bovino, ovócitos, maturação.

ABSTRACT

The use of biotechnologies has become increasingly frequent as a way to increase the efficiency of cattle reproduction in Brazil. One of the main techniques, *in vitro* embryo production, allows the production of a larger number of calves per cow with higher genetic potential in a shorter period. However, as it is a high-cost process, researchers are looking for ways to increase its efficiency. It has been identified that Beta-NGF, protein purified from seminal plasma of mammals, when administered to females during insemination, improves the function of the corpus luteum. Likewise, a positive correlation was also found between the amount of Beta-NGF in sperm and the rates of cleavage and blastocyst in the *in vitro* production of embryos, indicating possible action during the initial embryonic development. The aim of this study was to identify Beta-NGF receptors (p75 and Trk) in immature bovine oocytes and their cumulus cells and to verify the effect of Beta-NGF supplementation of the oocyte maturation medium in bovine embryo *in vitro* production routines. (PIVE). Cumulus oocyte complexes (COC) were marked by indirect immunofluorescence for p75 and Trk receptors and evaluated using laser scanning confocal microscopy. Four routines were also performed, where part of the oocytes were matured with medium supplemented with Beta-NGF and part with non-supplemented medium. Both receptors were located in oocytes and in the cells of the cumulus. Routines where oocyte maturation supplemented with Beta-NGF were used had better rates of cleavage and blastocyst formation (paired t-test, $p < 0.05$). Thus, it was demonstrated that Beta-NGF acts in both oocytes and granular cells, through both receptors, p75 and Trk, and that supplementation of the maturation medium with Beta-NGF is an alternative to improve the results of bovine *in vitro* embryo production.

Keywords: Beta-NGF, p75, Trk, bovine, oocytes, maturation.

RESUMEN

El uso de biotecnologías se ha vuelto cada vez más frecuente como una forma de aumentar la eficiencia de la ganadería en Brasil. Una de las técnicas principales, la producción de embriones *in vitro* (PIVE), permite la producción de un mayor número de terneros por vaca con alto potencial genético en un período de tiempo más corto. Sin embargo, como es un proceso de alto costo, se investigan formas de aumentar su eficiencia. Se ha identificado que la proteína Beta-NGF purificada del plasma seminal de mamíferos, cuando se administra a hembras durante la inseminación, mejora la función del cuerpo lúteo. Asimismo, también se encontró una correlación positiva entre la cantidad de Beta-NGF en el espermatozoides y las tasas de clivaje y blastocisto en la producción *in vitro* de embriones, lo que indica una posible acción durante el desarrollo embrionario temprano. El objetivo de este estudio fue identificar los receptores Beta-NGF (p75 y Trk) en los ovocitos inmaduros bovinos y sus células del cúmulo y verificar el efecto de la suplementación de Beta-NGF en el medio de maduración de ovocitos en las rutinas de producción *in vitro* de embriones bovinos (PIVE). Los complejos de ovocitos cúmulos (COC) se marcaron por inmunofluorescencia indirecta para receptores p75 y Trk y se evaluaron mediante microscopía confocal de barrido láser. También se realizaron cuatro rutinas PIVE, donde parte de los ovocitos se maduraron con medio suplementado con Beta-NGF y parte con medio no suplementado. Ambos receptores se ubicaron en los ovocitos y en las células del cúmulo. Las PIVEs en los que se utilizó la maduración de ovocitos suplementada con Beta-NGF tuvieron mejores tasas de clivaje y formación de blastocistos (prueba t pareada, $p < 0.05$). Por lo tanto, se demostró que Beta-NGF actúa tanto en los ovocitos como en las células granulares, a través de ambos receptores, p75 y Trk, y que la suplementación del medio de maduración con Beta-NGF es una alternativa para mejorar los resultados de las PIVEs bovinos.

Palabras clave: Beta-NGF, p75, Trk, bovino, ovocitos, maduración.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador de carne do mundo e a pecuária de corte é um dos principais ramos de seu agronegócio, além da produção de leite. Como modo de aumentar a eficiência da criação de gado, através da melhora do desempenho animal, utiliza-se de biotecnologias, principalmente durante a reprodução desses animais. A produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem tido um papel importante nesse processo, pois, através da coleta de ovócitos de fêmeas saudáveis de alto valor genético, o processo gera um número maior de embriões em um menor período de tempo, que podem ser transferidos para outras fêmeas receptoras de menor valor genético, aumentando assim o valor genético dos bezerros nascidos, explorando o potencial reprodutivo dos rebanhos bovinos ao máximo, aumentando a demanda e tornando a carne e o leite mais acessível ao consumidor. Entretanto, o processo de PIVE é extremamente custoso e o cultivo *in vitro* é sua etapa menos eficiente, sendo que apenas 30% dos ovócitos maturados chegam ao estado de blastocistos (MELLO et al., 2016; VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008).

Desse modo, pesquisas buscam estratégias que barateiem e aumentem a eficiência da aspiração folicular (OPU) e da produção *in vitro* de embriões (PIVE) (SANTOS et al., 2017), que consiste na coleta, maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV), cultivo *in vitro* (CIV) e transferência de embriões (TE) produzidos *in vitro* (GARCIA, 2017). O enfoque está na mimetização das condições naturais as quais são expostos os ovócitos, zigotos, embriões e espermatozoides *in vivo*, de modo que busca-se compreender as exigências metabólicas e fisiológicas de tais estruturas, a fim de se estabelecer uma condição ideal para o seu desenvolvimento embrionário inicial (VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008).

Silva (2018) identificou algumas proteínas na cabeça do espermatozoide associadas a uma melhor taxa de clivagem e algumas associadas a um melhor desenvolvimento embrionário. Dentre essas proteínas, a Beta-NGF se destacou por estar associada tanto à clivagem como com à formação de blastocistos. Aína Beta-NGF, quando administrada para fêmeas durante a inseminação, também melhora a função do corpo lúteo, podendo indicar que essa proteína melhoraria a fertilidade em bovinos (FENG; TAMADON; HSUEH, 2018; STEWART et al., 2018).

Como Silva (2018) identificou a presença da neurotrofina Beta-NGF na cabeça de espermatozoides de touro e também encontrou alta correlação da quantidade desta proteína com as taxas de clivagem e de blastocistos na produção *in vitro* de embriões bovinos, e como sabe-se que esta proteína age através de ligação em receptores de membrana plasmática de alta (TrkA) e baixa afinidade (p75) (REN et al., 2005) a importância deste estudo se baseia na expectativa de descobrir se esta proteína está relacionada com o melhoramento da maturação ovocitária e do desenvolvimento embrionário inicial através da localização dos receptores em ovócitos imaturos e suas células do cúmulo e da suplementação do meio de maturação *in vitro* com Beta-NGF.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Ciclo estral bovino

O ciclo estral bovino é a fase reprodutiva do animal, ocorrendo entre dois estros, ou seja, entre dois “cios” da fêmea. O estro é visto como o dia 0 do ciclo estral, e é neste período onde a fêmea começa a aceitar a monta e, logo em seguida, ovocita, sendo que, quando não ocorre a fecundação, o intervalo entre dois estros é de aproximadamente 21 dias, podendo variar de 17 à 24 dias (COLAZO; MAPLETOFT, 2014; CUNHA et al., 2019; VALLE, 1991).

A regulação endócrina do ciclo estral é realizada pelos hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-ovários. O hipotálamo produz GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas), que chega até a hipófise, ou glândula pituitária anterior, através do sistema porta-hipotalâmico-hipofisiário, estimulando a liberação de gonadotrofinas que são levadas pela corrente sanguínea até o ovário, sendo o FSH (hormônio folículo estimulante) que estimula o crescimento folicular e a hiperplasia nas células da granulosa e teca interna nos ovários, e o LH (hormônio luteinizante), que estimula a maturação e ovocitação dos folículos, além da produção de estradiol (estrógeno E2) pelas células da teca, e sua transformação juntamente com as células da granulosa, em corpo lúteo. Desse modo, nos ovários, os folículos em desenvolvimento secretam estradiol e o corpo lúteo, progesterona (P4). O estradiol estimula a manifestação do estro (cio) e a liberação de LH, e a progesterona é

importante para a manutenção da gestação (COLAZO; MAPLETOFT, 2014; CUNHA et al., 2019; VALLE, 1991; SANTOS, 2012).

De tal forma, divide-se o ciclo estral em duas fases: folicular e luteínica. A primeira, folicular, é a fase de desenvolvimento dos folículos ovarianos, sendo subdividida em proestro e estro. O proestro dura de 2 à 3 dias, e é onde a progesterona circulante diminui, e em contrapartida, devido à liberação GnRH (pico pré ovulatório), o FSH aumenta, estimulando o crescimento folicular e consequentemente, a produção de estradiol e o início do estro (cio), assim como ocorre o aumento de LH, que atuará na maturação final do folículo. No estro, que dura de 12 à 18 horas, devido ao estímulo pelo estradiol, além de aceitarem a monta, as vacas ficam inquietas, com postura arqueada, cérvix dilatada, útero fortemente contraído, e com muco vaginal límpido (CUNHA et al., 2019; VALLE, 1991, SOARES, JUNQUEIRA 2019).

Dando continuidade, a segunda fase, a luteínica, é a fase de ovulação e de desenvolvimento do corpo lúteo, e divide-se em metaestro e diestro. No metaestro (de 2 à 3 dias), ocorre a ovulação (ruptura do folículo após 12h do fim do estro) e a formação do corpo lúteo através de células da parede do folículo rompido (teca e granulosa), e como resultado, tem-se o aumento da progesterona e a diminuição do FSH, LH e estradiol, e a fêmea já não aceita mais ser montada. E para encerrar, no diestro, que dura aproximadamente 16 dias, a progesterona alcança sua concentração máxima e caso não ocorra a fecundação, o corpo lúteo é degenerado (luteólise), no proestro, através da prostaglandina F2a (PGF2a) produzida pelo endométrio, diminuindo a produção de progesterona e dando início à um novo ciclo. Caso contrário, ocorrerá a liberação de interferon trofoblástico, que impede a secreção da prostaglandina, mantendo o corpo lúteo e a produção de progesterona, pois esta é capaz de modificar o ambiente uterino, a fim de possibilitar o desenvolvimento embrionário. A progesterona modifica o ambiente uterino através da estimulação de mudanças na expressão gênica em células do endométrio, causando alterações no transporte de nutrientes, remodelação celular, angiogênese, proliferação e migração celular, e proteção dos tecidos contra células imunes da fêmea. (SOARES, JUNQUEIRA, 2019; CUNHA et al., 2019; GALIMBERTI et al., 2001; VALLE, 1991). A progesterona modifica o ambiente uterino através da estimulação de mudanças na expressão gênica em células do endométrio, causando alterações no transporte de nutrientes, remodelação celular, angiogênese, proliferação e

migração celular, e proteção dos tecidos contra células imunes da fêmea (BAZER et al., 2009; FORDE et al., 2011).

Além disso, o bovino, sendo uma espécie monovulatória, tem seu desenvolvimento folicular de forma sincronizada, em grupos de folículos, o que se denomina onda folicular. Desse modo, ocorre o recrutamento de um grupo de folículos primordiais para iniciar seu crescimento, sendo apenas um deles selecionado para adquirir capacidade ovulatória, se desenvolvendo mais rapidamente, enquanto os outros folículos entram em atresia devido à secreção de estradiol e inibina pelo folículo dominante (SOARES, JUNQUEIRA, 2019). A foliculogênese pode ser dividida em 3 fases: o crescimento folicular pré-antral (transição do folículo primordial para primário e formação dos secundários), crescimento antral (desenvolvimento dos folículos antrais iniciais dependentes de gonadotrofina para seu crescimento), e a fase de crescimento antral terminal (os folículos antrais atingem o estágio pré-ovulatório) (Fig. 1) (LIMA et al, 2016).

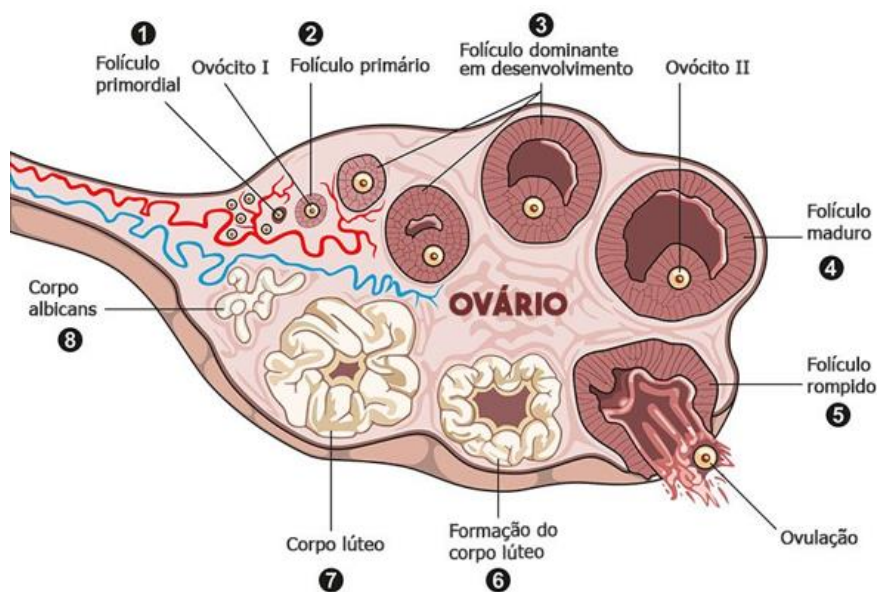


Figura 1: Ilustração representativa do desenvolvimento folicular até o momento da ovulação.
Fonte: adaptado de MD.Saúde (<https://www.mdsaude.com/>).

2.2 Produção *in vitro* de embriões bovinos

Quando *in vivo*, o folículo pré-ovulatório se rompe (Fig. 2), liberando o ovócito na tuba uterina (ovulação), onde poderá ocorrer a fecundação. Entretanto, para a produção *in vitro* de embriões, existem duas alternativas: a obtenção de ovócitos de animais vivos, ou a aspiração *post mortem*. Quando vivas, é possível realizar nas fêmeas a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia (OPU) (BUENO, BELTRAN, 2008), além da laparoscopia via flanco ou via vaginal. No *post mortem*, realiza-se a punção folicular diretamente dos ovários extraídos da fêmea (MELLO et al, 2016). A eficiência do processo de punção está diretamente relacionada à quantidade, qualidade e morfologia do complexo cúmulo-ovócito (CCO) que será obtido para realização da PIVE. Além disso, *in vivo*, a maturação tem início após o pico pré-ovulatório de LH, mas assim que o CCO é aspirado do folículo, perdendo o contato com as células foliculares, inicia-se sua maturação (BUENO, BELTRAN, 2008; MELLO et al, 2016). O ideal é que sejam aspirados folículos entre 2 e 8 mm, pois os menores não são capazes de reiniciar a meiose, e os maiores correm o risco de já estarem em processo de atresia ou maturação. Assim, o melhor momento para a aspiração é antes do pico de LH (GONÇALVES et al., 2008).

A maturação *in vitro* dura de 18 à 22h, e o ovócito sofre mudanças nucleares (sai a fase de diplóteno da primeira prófase (meiose I) e atinge a metáfase II (meiose II)), e citoplasmáticas, como o aumento da produção de lipídeos como fonte de energia, aproximação das mitocôndrias aos lipídeos, diminuição do Complexo de Golgi, alinhamento dos grânulos corticais próximos ao oolema para realizar o bloqueio celular, e detenção da síntese de ribossomos. Já as células do cúmulo, durante a maturação, produzem ácido hialurônico (muco), mucificando-se e expandindo (Fig. 4). O mecanismo de ação do ácido hialurônico não está totalmente elucidado, mas sabe-se que a remoção dessas células implica em queda nas taxas de fertilização, podendo estar associado à capacitação espermática e construção de uma camada protetora, criando um ambiente de seleção para os espermatozoides mais ativos, e prevenindo alterações da zona pelúcida (ZP). Após o tempo de maturação, o ovócito completa a expulsão do primeiro corpúsculo polar, se tornando apto à fecundação. Essas alterações ocorrem de modo a preparar o ovócito para a fecundação, que é a fase em que a transcrição dos genes voltará a ser realizada (BUENO, BELTRAN, 2008; GONÇALVES et al., 2008; MELLO et al, 2016; SCANZANI, 2013).

Para que estes eventos ocorram *in vitro*, é necessário que o meio de cultivo onde ficarão os ovócitos, durante 22h à 24h, mimetize as condições encontradas no sistema reprodutor da fêmea. Muitos laboratórios utilizam meios suplementados com soro fetal bovino (SFB), FSH, LH, e estradiol, em controle total de condições ambientais, como temperatura e atmosfera gasosa. Isso deve-se ao fato de existirem junções intercomunicantes (GAP) no CCO, entre as células do cúmulo e o ovócito, que são importantes para a passagem de nutrientes e substâncias reguladoras da maturação (BUENO, BELTRAN, 2008; GONÇALVES et al., 2008; MELLO et al, 2016).

Ao final da maturação, caso o ovócito seja fecundado, gerará o zigoto, que passará por repetidas divisões celulares, atingindo o estágio de mórula, com início da compactação dos blastômeros ou células embrionárias, retração do embrião (aumentando o espaço perivitelínico) e formação de junções de adesão e oclusão entre os blastômeros. Com a compactação e retração dos blastômeros, cria-se um gradiente osmótico, atraindo água para o espaço perivitelínico, criando a blastocèle do blastocisto inicial. O blastocisto expandido contém sua blastocèle aumentada, devido à entrada de maior quantidade de água, que eventualmente provocará aumento do tamanho do embrião e redução da espessura da zona pelúcida (ZP), com sua posterior eclosão, onde o embrião será capaz de entrar em contato, diretamente, com os tecidos maternos através da implantação (BUENO, BELTRAN, 2008; MELLO et al, 2016, VIANA, 2009).

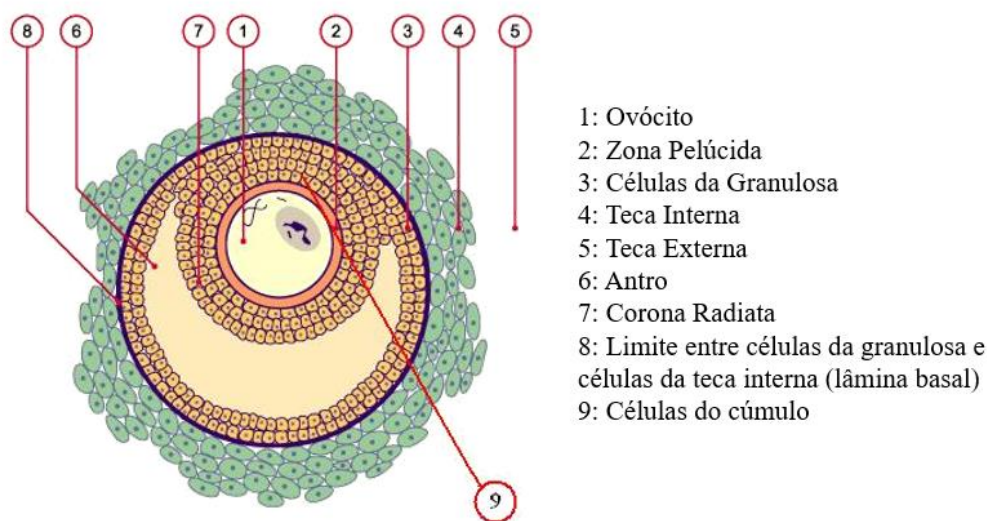


Figura 2: Ilustração representativa do folículo pré-ovulatório, contendo em seu interior o CCO.
 Fonte: adaptado de <https://seikienokawa.wordpress.com/page/3/>.

2.3 Proteína Beta-NGF

Sabe-se que o plasma seminal, produzido nas glândulas sexuais acessórias masculinas, contém proteínas, fatores de crescimento, citocinas e hormônios, e já foi comprovada associação entre o contato com o sêmen e a indução da ovulação (RATTO et al., 2019). Assim, foi identificado e purificado um componente bioquímico do plasma seminal de mamíferos que estimula a ovulação, nomeando-o fator de indução de ovulação (OIF) (ADAMS et al., 2005).

Mais tarde, foi descoberto se tratar de uma neurotrofina, a beta subunidade do fator de crescimento nervoso (Beta-NGF), que já conhecidamente promove a sobrevivência e o crescimento neuronal, além de poder estar relacionada com fatores endócrinos ao ser absorvida através do endométrio e chegar ao sistema nervoso central onde influenciaria na liberação do hormônio luteinizante (LH), desencadeando a ovulação e o desenvolvimento do corpo lúteo (EL ALLALI et al., 2017). Corroborando, a proteína Beta-NGF, quando administrada para fêmeas durante a inseminação, também melhora a função do corpo lúteo, podendo indicar que essa proteína melhoraria a fertilidade em bovinos (FENG; TAMADON; HSUEH, 2018; STEWART et al., 2018). Silva (2018) identificou a presença da Beta-NGF na cabeça de espermatozoides de touro e também encontrou alta correlação da quantidade desta proteína com as taxas de clivagem e de blastocistos na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Essa proteína age através de ligação em receptores de membrana plasmática de alta (TrkA) e baixa afinidade (p75) (REN et al., 2005). Sendo receptores de neurotrofina, o p75 se enquadra na família dos receptores indutores de apoptose, e o TrkA é um receptor de tirosina quinase, específico para NGF, que estimula a prevenção da morte celular programada (apoptose) durante o desenvolvimento (BIBEL et al, 1999). Dessa forma, a Beta-NGF possui uma maior afinidade pelo receptor TrkA, mas quando associado ao p75, seu estímulo é aumentado. No entanto, sem o TrkA, o p75 induz apoptose. (JANA; KOSZYKOWSKA; CZARZASTA, 2011).

Além disso, sabe-se que o receptor TrkA já foi encontrado em células da teca bovinas (STEWART et al., 2018), ovários porcinos (JANA; KOSZYKOWSKA; CZARZASTA, 2011) e ambos os receptores (TrkA e p75) foram encontrados em ovários de humanos, de ratos e porcos (EL ALLALI et al., 2017). Ren (2005) encontrou ainda ambos os receptores

(TrkA e p75) em células da granulosa (cúmulo), da teca, intersticiais e do corpo lúteo, em ovários de cabras, além de em células epiteliais e musculares da ampola e do istmo da tuba uterina, e ainda em células epiteliais e glândulas do útero, dando forte indício de função parácrina e autócrina da Beta-NGF no sistema reprodutivo de cabras.

Entretanto, o receptor Trk possui os tipos TrkA, TrkB e TrkC (BIBEL et al, 1999), sendo todos receptores de neurofinas, o TrkA, como já dito, se liga à NGF (fator de crescimento neuronal), o TrkB à BDNF e à NT4 (fator neurotrófico derivado do cérebro e neurotrofina 4) e o TrkC com o NT-3 (neurotrofina-3) (YAMAMOTO et al, 1996; PIÑON et al, 1996).

3. JUSTIFICATIVA

Dado o exposto, a importância deste estudo se baseia na expectativa de descobrir se esta proteína está relacionada com o melhoramento da maturação ovocitária e do desenvolvimento embrionário inicial de bovinos. Para isso, a localização de receptores de Beta-NGF nas estruturas envolvidas durante esse processo (espermatozoide, ovócito imaturo, ovócito maturado, zigoto, mórula e blastocisto) é o caminho para entender seu mecanismo de ação. Ademais, a suplementação dos meios com Beta-NGF, onde são mantidas tais estruturas, é uma ferramenta a ser utilizada, uma vez que, caso encontrados os receptores, e a suplementação demonstrar resultados estatisticamente significativos de melhora, a ação da proteína estaria comprovada naquela estrutura.

Este estudo buscou, em princípio, localizar os receptores de Beta-NGF, Trk e p75, apenas nos ovócitos imaturos, por serem as estruturas iniciais, e também como forma de padronização de metodologia. Além disso, busca-se realizar a suplementação com a proteína Beta-NGF durante a maturação desses ovócitos, para que, futuramente, dando continuidade, todas as estruturas passem pelo mesmo processo de marcação e suplementação, além de uma quantificação dos receptores. Assim, espera-se que o melhor resultado em números de embriões viáveis ocorra ao se suplementar com Beta-NGF o meio onde é trabalhado o tecido com maior número de receptores para essa proteína, como o meio de maturação (onde são maturados os ovócitos), fertilização (onde os ovócitos maturados e espermatozoides são reunidos para a fertilização, formando o zigoto) ou cultivo (onde as mórulas e blastocistos são cultivados).

Dessa forma, a proteína Beta-NGF poderá futuramente ser aplicada como suplemento de meios utilizados durante a produção *in vitro* de embriões bovinos, sendo que a escolha do melhor meio para ser suplementado dependerá do resultado destes futuros trabalhos. Assim, a eficiência dos processos seria aumentada, barateando sua técnica, diminuindo a perda embrionária inicial e melhorando a qualidade dos embriões produzidos, não apenas na bovinocultura, mas provavelmente durante a produção *in vitro* de outros mamíferos.

4. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Verificar a atuação da proteína Beta-NGF durante a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos.

3.2. Objetivos específicos

- Verificar a existência dos receptores da proteína Beta-NGF, p75 e Trk, no ovócito imaturo bovino e suas células do cúmulo.
- Verificar o efeito da suplementação de Beta-NGF no meio de maturação ovocitária durante a produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Suplementação com Beta-NGF durante a maturação

5.1.1 Dinâmica da produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões foi realizada em 4 semanas, com uma rotina fixa, denominando-se os dias como -1, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, onde em todo dia -1 realizou-se a suplementação do meio de maturação dos ovócitos imaturos (Tab. 1).

Tabela 1: Dinâmica da produção *in vitro* de embriões bovinos, onde todo dia 0 é onde ocorre a fertilização *in vitro* (FIV).

DIAS	ATIVIDADES
-1	Aspiração folicular <i>pós-mortem</i> Seleção e maturação <i>in vitro</i> (MIV) de ovócitos
0	Fertilização <i>in vitro</i> (FIV) de ovócitos maturados (após 22h de maturação)
1	Desnudamento (de 18 à 22h após a fecundação) e início do cultivo <i>in vitro</i> dos prováveis zigotos
2	Observação da taxa de clivagem (48h após a FIV) Embriões com $\cong 2$ células
3	Embriões com $\cong 4$ células
4	Embriões com $\cong 8$ células
5	Mórula
6	Blastocisto inicial
7	Contagem dos blastocistos (iniciais, expandidos, eclodidos)

Fonte: autoria própria.

5.1.2 Ovócitos e sêmen

Ovários foram coletados a partir de vacas abatidas em abatedouro comercial da cidade de Uberlândia, e armazenados em garrafas térmicas contendo soro fisiológico a 37°C. Após lavar os ovários com solução salina, os mesmos foram mantidos em banho maria a 37°C para aspiração folicular. Os folículos antrais ovarianos foram aspirados utilizando seringas de 5 mL e agulha 18G e o fluido aspirado foi transferido para tubos de 50 mL para a sedimentação, durante 15 minutos. O sedimento foi depositado em placas de poliestireno de 90 x 15 mm e o rastreamento dos ovócitos foi realizado com auxílio de microscópio estereoscópio.

Selecionaram-se os ovócitos classificados como grau I (ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração escura, com ausência de vacúolos, e células do cúmulo compactas com várias camadas) e grau II (ooplasma com pequenas áreas não homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração escura, com ausência de vacúolos, e células do cúmulo compactas com pelo menos

mais de 5 camadas) de acordo com a classificação de STOJKOVIC et al (2001), pois representam os melhores ovócitos em qualidade para PIVEs (Fig. 3).

As amostras de sêmen utilizadas nas PIVEs foram obtidas em central de processamento de sêmen (SEMBRA), de um touro de fertilidade comprovada. Em todo o trabalho utilizou-se apenas o sêmen de um único touro da raça Girolando.

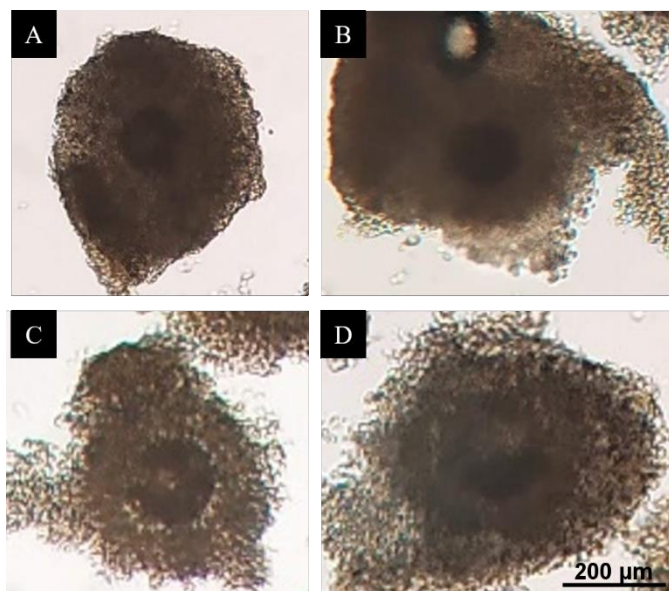


Figura 3: Ovócitos utilizados nas PIVEs, classificados como grau I (A e B) e grau II (C e D) segundo Stojkovic (2001). Fonte: autoria própria.

5.1.3 Fixação dos ovócitos imaturos

Para posterior imunofluorescência, alguns dos complexos cúmulo ovócito selecionados foram fixados com paraformaldeído 4%, durante 1h, em geladeira (4°C). Após, foram lavados em PBS 1x (NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4) e armazenadas em microtubos com PBS 1x, lacrados com parafilme, em geladeira.

5.1.4 Maturação *in vitro* dos ovócitos

Os ovócitos rastreados foram depositados em uma placa de poliestireno de 35 x 10mm, contendo meio de lavagem TCM – 199 HEPES (0,2 mM piruvato sódico, 10 mM HEPES ácido, 10 mM de HEPES sódico, 5 mM bicarbonato de sódio, 83 μg/mL de amicacina, suplementado com 10% de soro fetal bovino), e a partir dessa placa foram selecionados segundo a classificação de Stojkovic (Fig. 3), sendo contatos e depositados em

uma nova placa com meio de lavagem. Uma terceira lavagem foi realizada em microgotas de 100 μ L de meio de lavagem, e após foram divididos entre 6 gotas de 100 μ L de meio de maturação TCM 199 com bicarbonato (0,2 mM piruvato sódico, 26 mM bicarbonato de sódio, 83 μ g/mL de amicacina, 1 μ g/mL FSH, 5 μ g/mL LH, suplementado com 10% de soro fetal bovino). Neste experimento, 3 gotas foram suplementadas com 100 ng/mL da proteína isolada Beta-NGF (Thermo Fisher Scientific 11050HNAC), para posterior comparação entre as taxas de clivagem e formação de blastocistos entre os ovócitos mantidos nas 3 gotas controle e nas 3 gotas suplementadas. Escolheu-se a concentração de 100 ng/mL baseando-se no trabalho de Crispo et al. (2016).

Finalmente, foram transferidos de 15 à 20 ovócitos por gota de 100 μ L de meio de maturação, cobertas com óleo mineral em placas de petri de poliestireno de 60 x 15 mm, e mantidos por cerca de 22h em estufa na temperatura de 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂, para sua maturação (Fig. 4).

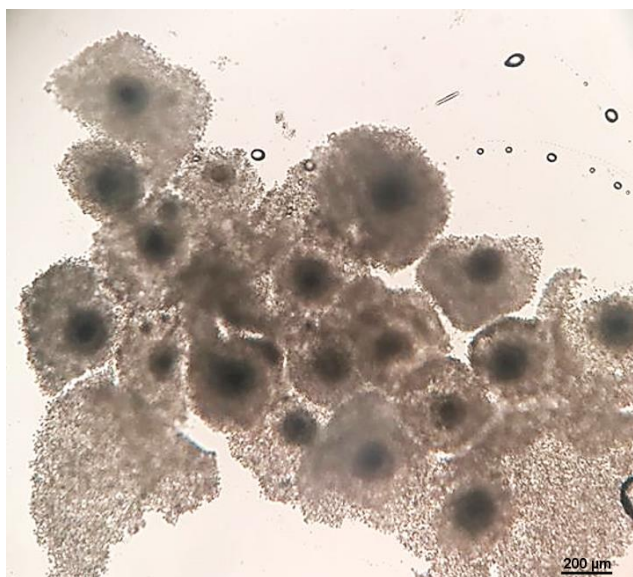


Figura 4: Ovócitos maturados, após serem mantidos por 22h em meio de maturação. Fonte: autoria própria.

5.1.5 Fertilização *in vitro*

Os ovócitos maturados (Fig. 4) foram lavados três vezes em microgotas de 100 μ L de meio TALP-Fert (suplementado com 0,2 mM piruvato sódico, 20,4 μ M penicilamina, 10,2 μ M hipotaurina, 1,97 μ M epinefrina, 10 μ g/mL heparina, 6 mg/mL BSA e 83 μ g/mL

amicacina), e foram transferidos para gotas de 100 µL de meio TALP-Fert cobertas com óleo mineral em placas de poliestireno de 60 x 15 mm (Fig. 5). A fim de selecionar os espermatozoides viáveis, uma dose de sêmen foi descongelada em banho maria a 37°C por 30 segundos e foi depositada sobre um gradiente de Percoll, preparado previamente em um tubo Falcon de 15 mL, composto pela camada superior de Percoll 45% (500 µL de Percoll 90% e 500 µL de meio TALP-Sperm (Tyrode-albumina-lactato-piruvato, acrescido de 0,2 mM piruvato sódico e 83 µg/mL amicacina) e a camada inferior de 1 mL de Percoll 90% (Percoll, solução 10x, solução estoque 2mM CaCl₂, solução estoque 0,4 mM MgCl₂, 0,1 mM DL-ácido láctico e 20 mM bicarbonato de sódio).

O gradiente foi centrifugado a 2400 rpm, durante 30 minutos, e transferiu-se 30 µL do sedimento formado para um *ependorf* denominado tubo FIV (contendo 30 µL de meio TALP-Fert). Deste tubo, transferiu-se 5 µL para o tubo Motilidade (com 150 µL de meio TALP-Fert) e mais 5 µL para o tubo Concentração (com 250 µL de Água Milli-Q). O tubo FIV foi armazenado em estufa (38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂), com tampa aberta, até o momento da fertilização *in vitro*.

O conteúdo do tubo Motilidade foi utilizado para avaliação de motilidade, onde 30 µL foram colocados sob lâmina aquecida, coberta com lamínula, e analisada em objetiva de 10X, comparando-se a proporção, em porcentagem, de espermatozoides que apresentavam mobilidade de qualquer tipo (progressiva, oscilatória, circular ou retrógrada) com a quantidade de espermatozoides totais.

Já o conteúdo do tubo Concentração foi utilizado para análise deste mesmo fim, através de contagem em Câmara de Neubauer (objetiva de 40X, contagem dos 5 quadrados diagonais, considerando-se os espermatozoides presentes sob as linhas esquerdas e superiores), realizando-se uma média entre a contagem nas duas malhas da câmara.

Para o cálculo de diluição dos espermatozoides utilizados na fertilização *in vitro* (tubo FIV), utilizou-se a seguinte fórmula:

$$(\text{CONCENTRAÇÃO}) \times (\text{MOTILIDADE}) \times 50 / 1000 - 50 = \text{VOLUME DE TALP-FERT}$$

Onde o resultado obtido é o volume, em microlitros, de meio TALP-Fert a ser acrescentado no tubo FIV. Ao final, cada gota foi fecundada com 4 µL do conteúdo final do

tubo FIV (aproximadamente 100 mil espermatozoides por gota) e a placa foi mantida em estufa aquecida (38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂), de 18h à 22h.

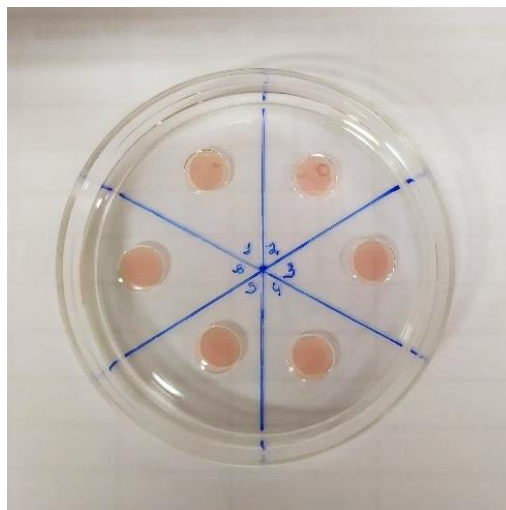


Figura 5: Placa de poliestireno de 60 x 15 mm, com gotas de 100 μ L de meio TALP-Fert cobertas com óleo mineral.

5.1.6 Cultivo *in vitro*

Os prováveis zigotos foram desnudados mecanicamente por pipetações sucessivas, e após foram lavados 3 vezes em gotas de 100 μ L de meio de cultivo SOF (acrescido de 0,2 mM piruvato sódico, 5 mg/mL BSA, 2,5% de soro fetal bovino e 83 μ g/mL amicacina) e transferidos para gotas de 100 μ L de meio SOF cobertas com óleo mineral em placas de poliestireno de 60 x 15 mm, sendo cultivados por 6 dias. A taxa de clivagem foi avaliada 48h após a fecundação *in vitro* por meio da avaliação das estruturas que apresentavam duas ou mais células, para fins de controle (Fig. 6A). Sete dias após a fecundação, a taxa de blastocistos foi avaliada a partir da contagem de estruturas que alcançaram esse estágio de desenvolvimento, sem diferenciação entre blastocistos iniciais, expandidos ou eclodidos (Fig. 6B).

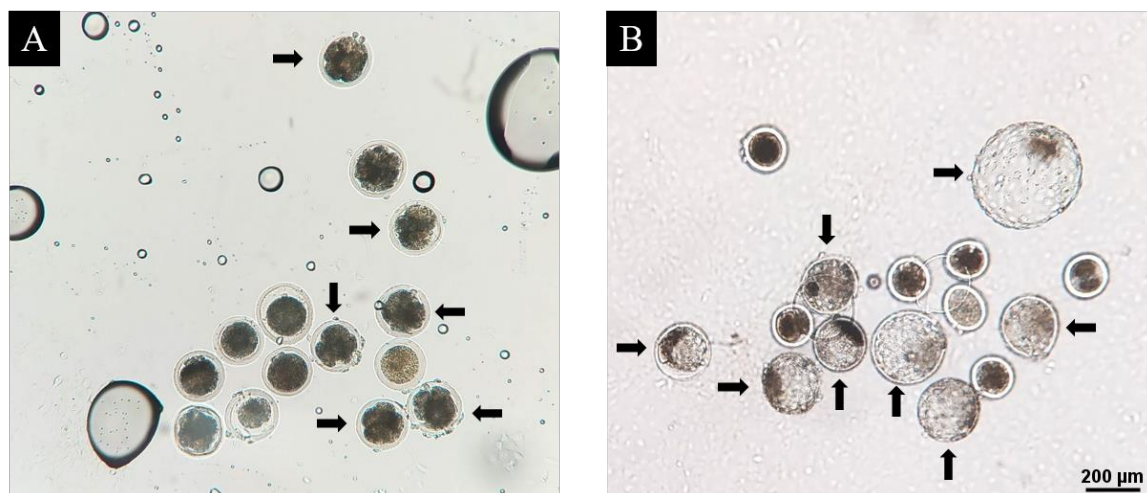


Figura 6: A: embriões clivados no dia 2 (seta); B: blastocistos expandidos e eclodidos no dia 7 (seta). Fonte: autoria própria.

5.1.7 Análise estatística das FIVs

A taxa de clivagem foi determinada 48 horas após a fertilização *in vitro* por meio de contagem dos embriões que apresentavam duas ou mais células com o auxílio de microscópio estereoscópico (taxa de clivagem = nº de embriões/ nº de ovócitos iniciais).

A contagem dos blastocistos foi realizada no sétimo dia após a fecundação. A taxa de blastocisto foi determinada em relação ao número de ovócitos que iniciaram a clivagem e chegaram a este estágio de desenvolvimento (taxa de blastocisto = nº de blastocisto/ nº de embriões utilizados para cálculo da taxa de clivagem).

Para verificar a existência de diferença entre o grupo suplementado e o não suplementado aplicou-se o teste T pareado, utilizando-se o software Excel/Action (Microsoft).

5.2 Imunofluorescência para identificação dos receptores p75 e Trk

Após fixados com paraformaldeído 4% e mantidos em solução de PBS 1x à 4°C, 15 ovócitos imaturos foram novamente lavados em solução de PBS 1x (acrescido de 2% de SFB) e divididos entre 3 lâminas silanizadas (silano 2,5%) para melhor aderência das estruturas. Para a permeabilização da membrana plasmática, foi utilizada solução de Triton

X-100 0,1%, durante 30 min, em temperatura ambiente. Após, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS 1x, durante 5 min cada vez. A recuperação antigênica foi feita com completa imersão das lâminas em solução de Citrato de Sódio (pH 6), em fervura, por 10 min no micro-ondas (ciclos de 5 em 5 segundos). Após secagem, em temperatura ambiente por 20 min, as lâminas foram lavadas mais 3 vezes com PBS 1x. Os sítios inespecíficos foram bloqueados através de solução de Soro Fetal Bovino (1:9 diluído em PBS 1x), por 30 min, em temperatura ambiente. Após secagem, as lâminas foram divididas então em 3 grupos: 1) incubada com anticorpo primário policlonal de coelho anti-receptor p75 (NGFR-p75 Sigma N3908, 1:500), 2) incubada com anticorpos primários policlonal de coelho e anti-receptor Trk (Pan-Trk Abcam EPR17341, 1:250), e 3) lâmina controle, incubada com SFB (1:9 diluído em PBS 1x). As lâminas foram incubadas *overnight*, em câmara úmida, à 4°C.

Após 3 novas lavagens com PBS 1x, todas as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário (A11012 Alexa Fluor 594 Invitrogen, 1:500), por 2h, à temperatura ambiente, em sala escura e então lavadas 5 vezes com PBS 1x. Como corante de núcleos celulares, utilizou-se o Yo-Pro-1 Iodide (Y3603 Invitrogen, 2,5:1000), durante 40 min, em sala escura, exceto na lâmina controle (sem anticorpo primário). Após 5 lavagens com PBS 1x, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada (glicerol e tampão carbonato 1:9) e lamínula, sendo seladas com esmalte. A fluorescência foi analisada no microscópio confocal de varredura a laser Zeiss LSM 510-meta. A metodologia utilizada com foi adaptada de Idrees (2019), Li et al. (2010), Pan et al. (2019) e Tan et al. (2019).

6. RESULTADOS

6.1 Suplementação com Beta-NGF no meio de maturação *in vitro* favorece as taxas de clivagem e blastocistos

Os resultados obtidos em cada rotina de PIVE estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2: Número de ovócitos imaturos, embriões clivados e blastocistos, nos grupos suplementado (S) e controle (C), em cada uma das rotinas.

Rotinas	1		2		3		4	
Grupos	S	C	S	C	S	C	S	C
Ovócitos imaturos	43	46	49	46	49	43	47	45
Clivados	33	32	31	23	35	25	29	24
Blastocistos	10	6	16	8	12	6	13	8

Através do Teste T Pareado, que comparou as taxas de clivagem e blastocisto entre os grupos suplementado e controle, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) em ambos os casos (Tab. 3).

Tabela 3: Taxas de clivagem e de blastocistos obtidas em cada rotina de PIVE com meio suplementado com Beta-NGF e não suplementado e valor de p obtido na comparação dos grupos utilizando-se o teste T pareado.

Rotinas	Taxa de clivagem		Taxa de blastocistos	
	Suplementado	Controle	Suplementado	Controle
1	76,74%	69,57%	30,30%	18,75%
2	63,27%	50,00%	51,61%	34,78%
3	71,43%	58,14%	34,29%	24,00%
4	61,70%	53,33%	44,83%	33,33%
Médias	68,29%	57,76%	40,26%	27,72%
Valor de P	0,0072		0,0033	

6.2 Ovócitos imaturos e células do cúmulo expressam ambos receptores de Beta-NGF (p75 e Trk)

A marcação pela técnica de imunofluorescência indireta, para se avaliar a expressão de receptores Trk e p75, analisada por microscopia confocal de varredura a laser, demonstrou

principalmente a presença de ambos os receptores nos ovócitos imaturos em si (Fig. 7 e 9). Ademais, ao dar enfoque às células do cúmulo, nota-se que estas também apresentam receptores p75 e Trk (Fig. 8 e 10). Os ovócitos imaturos da lâmina controle, que não foram incubados com o anticorpo primário e nem com o Yo-Pro-1 Iodide, não demonstraram fluorescência significativa.

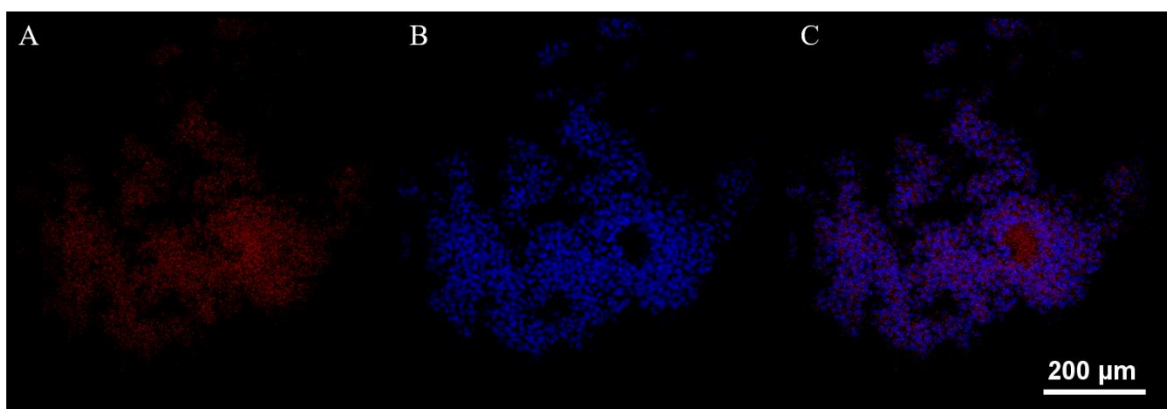


Figura 7: Ovócito imaturo e células do cúmulo. Marcação de receptores p75 (A), marcação de núcleos com Yo-Pro-1 Iodide (B) e sobreposição de ambos (C).

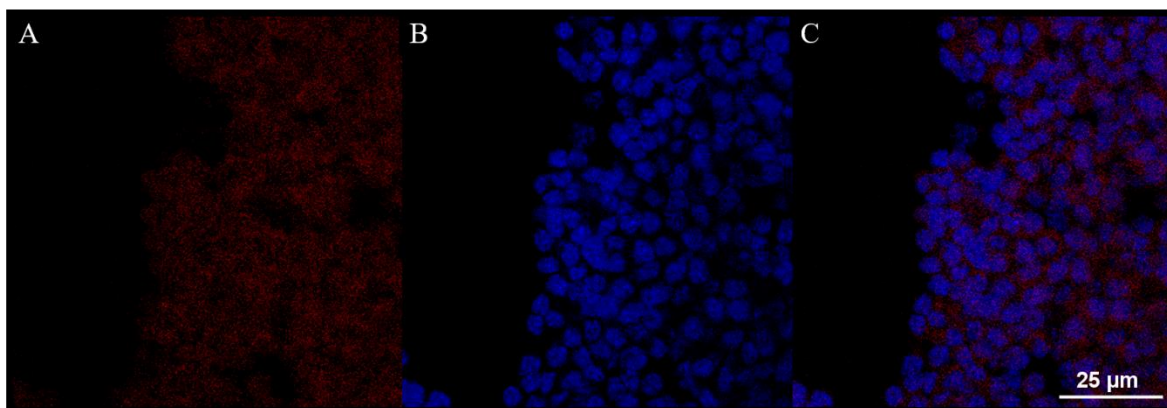


Figura 8: Células do cúmulo de ovócito imaturo. Marcação de receptores p75 (A), marcação de núcleos com Yo-Pro-1 Iodide (B) e sobreposição de ambos (C).

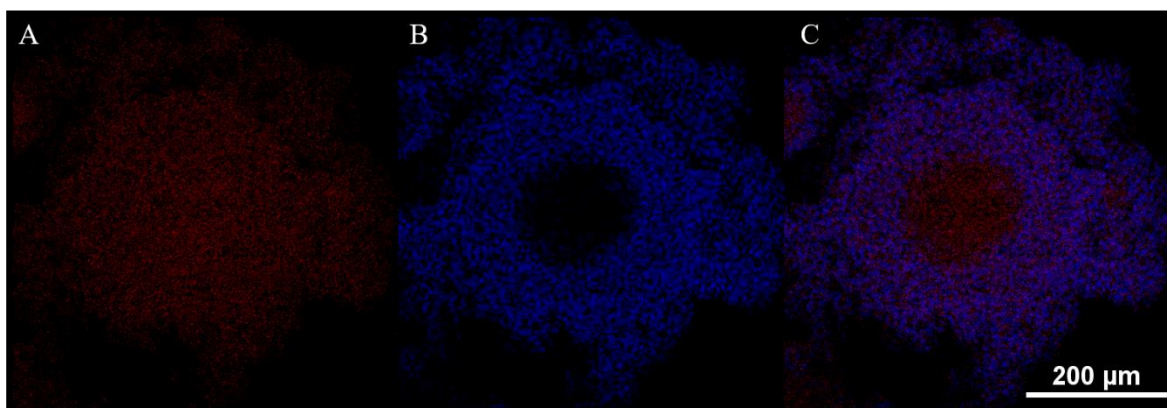


Figura 9: Ovócito imaturo e células do cúmulo. Marcação de receptores Trk (A), marcação de núcleos com Yo-Pro-1 Iodide (B) e sobreposição de ambos (C).

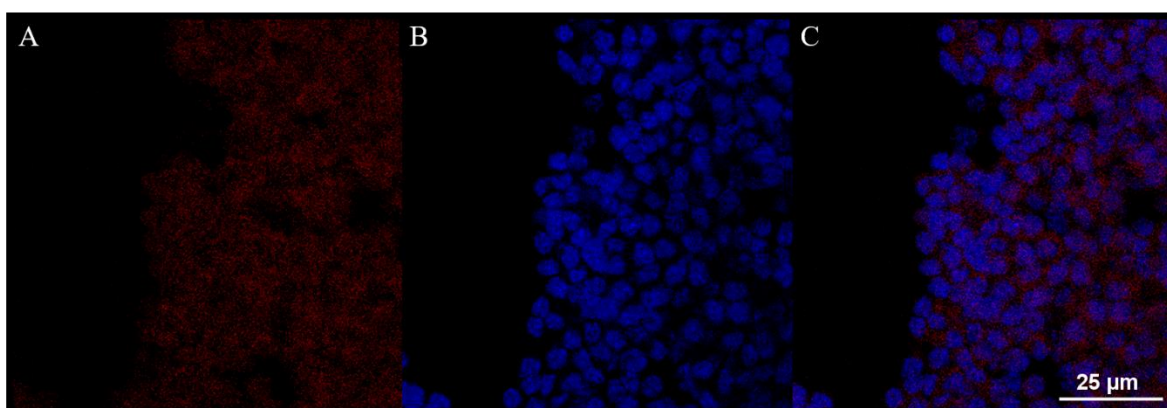


Figura 10: Células do cúmulo de ovócito imaturo. Marcação de receptores Trk (A), marcação de núcleos com Yo-Pro-1 Iodide (B) e sobreposição de ambos (C).

7. DISCUSSÃO

Atualmente já se utilizam substâncias nutricionais e hormonais suplementares para melhorar o processo de maturação, como as gonadotrofinas (FHS, LH), líquido folicular ou sérico, hormônios tireoidianos, bem como estudos também já comprovaram a atuação positiva do fator de crescimento (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), ativina A e inibina A (SILVA et al, 2005). Os resultados do presente trabalho demonstram que a suplementação com Beta-NGF em meio de maturação ovocitária também tem atuação positiva neste processo. As mudanças nucleares e citoplasmáticas que ocorrem no complexo cúmulo ovócito (CCO), durante sua maturação, são de extrema importância para o momento da fecundação, assim como para o desenvolvimento inicial do embrião. Dessa forma, as

condições de maturação *in vitro*, como a composição do meio, temperatura, e atmosfera gasosa podem influenciar diretamente no sucesso da produção *in vitro* de embriões (PIVE). Isso pode ser comprovado mediante comparação entre ovócitos maturados em meios e condições distintas, e suas taxas de formação de blastocistos subsequentes (SILVA et al, 2005), assim como feito no presente trabalho. As melhores taxas de clivagem obtidas no grupo suplementado com Beta-NGF, mostram que um maior número de ovócitos finalizou sua maturação. Já a as melhores taxas de blastocistos obtidas neste mesmo grupo, demonstram que os efeitos benéficos da suplementação sobre a maturação ovocitária, permanecem durante o desenvolvimento embrionário inicial. Podemos assim especular que de forma geral, mesmo que a maturação ovocitária permita a fecundação e o início da clivagem, ela pode não ser suficiente para que o desenvolvimento embrionário inicial ocorra satisfatoriamente. Ou seja, especificamente em relação aos resultados deste trabalho, a suplementação do meio de maturação ovocitária com Beta-NGF não só aumentou o número de ovócitos maturados, como melhorou a qualidade destes ovócitos, já que a taxa de blastocisto foi melhor no grupo suplementado.

A presença de receptores tanto no ovócito como nas células do cúmulo corrobora com os bons resultados obtidos com a suplementação dos meios de maturação, pois o CCO possui comunicação intercelular entre si, através de projeções transzonais (TZP), sendo extensões das células do cúmulo que atravessam a zona pelúcida, chegando à membrana do ovócito. Neste ponto estão presentes junções comunicantes (GAP) e junções aderentes ou de oclusão (Fig. 11), que são importantes para o desenvolvimento de ambas as estruturas, com a comunicação ocorrendo de maneira bidirecional (LIMA et al, 2016; SANTOS, 2012), permitindo que a proteína Beta-NGF e metabólitos produzidos pelas células do cúmulo cheguem até o ovócito.

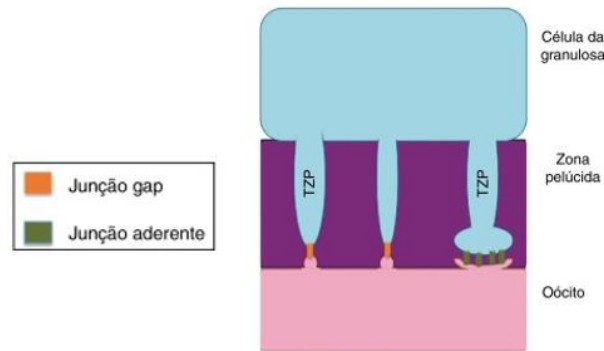


Figura 11: Representação ilustrativa das projeções transzonais (TZP) entre ovócito e células da granulosa (cúmulo) e suas respectivas junções GAP e aderentes. Fonte: Adaptado de LIMA et al. (2016).

Sabe-se que no período precedente à ovulação, ocorre certa retração das projeções transzonais (TZP) no folículo pré-ovulatório, para que este se desprenda da parede folicular e possa ocorrer a ovulação. Ao mesmo tempo, há um aumento de receptores TrkA e da expressão gênica de NGF, nas células da teca. Devido a isso, Mayerhofer et al. (1996) concluiu que, através de bloqueio imunológico da ação da NGF e da ativação de seu receptor TrkA em ovários bovinos, inibe-se a ovulação, sugerindo que esta proteína estaria diretamente relacionada com a cascata ovulatória, visto que a ativação do receptor TrkA afeta a integridade das TZP. Todavia, a estimulação dos folículos com outras neurotrofinas, como a NT3, a NT4, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o fator de crescimento epidermal, não causou alteração das TZP (MAYERHOFER et al, 1996). Corroborando, o estudo de Zanzuan et al. (2004), demonstrou que o LH funciona como regulador da produção de NGF e seus receptores, sendo que o LH estimula o processo de ovulação. Isso posto e considerando os resultados deste trabalho, fica claro que a Beta-NGF atua de formas diferentes: induzindo a ovulação e estimulando a maturação dos ovócitos.

Mais importante, o estudo de Mayerhofer et al. (1996) comprova a produção de NGF pelas células da teca bovina, assim como outros estudos comprovam a expressão dessa proteína em ovários humanos (RETAMALES-ORTEGA et al., 2017) e ovários de cricetos (hamsters) (SHI et al., 2004). Desse modo, sugere-se que a aspiração folicular, tanto *in vivo* quanto *post mortem*, na realização de rotinas de produção *in vitro* de embriões (PIVE), interrompe o contato do CCO com a Beta-NGF, e a suplementação dessa proteína no meio de maturação, mimetiza o ambiente de maturação *in vivo*, gerando uma melhor maturação e consequentemente, uma maior taxa de fecundação, clivagens e blastocistos gerados.

A cascata de ação do receptor TrkA é ativada através da ligação com a proteína Beta-NGF, ativando o fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e a proteína quinase (MAPK), a fim de promover a sobrevivência celular e sua proliferação. Ocorre a ativação da fosfolipase do tipo $C\gamma$ (PLC γ), resultando na produção de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3), culminando na secreção de cálcio dos estoques citoplasmáticos. Entretanto, não se sabe muito sobre a cascata de ativação do receptor p75 (CHAVES et al, 2012), mas sabe-se que mesmo que a Beta-NGF possua maior afinidade pelo receptor TrkA, quando este está associado ao p75, o estímulo é aumentado. No entanto, sem o TrkA, o p75 induz apoptose (JANA; KOSZYKOWSKA; CZARZASTA, 2011). No presente trabalho foi encontrado ambos os receptores, o que corrobora com os bons resultados obtidos com a suplementação com Beta-NGF.

Além disso, estudos já comprovaram a expressão da NGF e sua atuação durante a maturação meiótica, em ovócitos bovinos, murinos, suínos e de *Xenopus* (rãs) (SHI et al., 2004; CARRIERO et al., 1991; NEBREDÁ et al., 1991; BARBONI et al., 2002; PAPP et al., 2005; SILVA et al., 2005). Em ovinos, analisou-se os níveis de NGF no fluido folicular antes e após 20h de estimulação com gonadotrofinas, e os resultados demonstraram que o GnRH causa um grande aumento de NGF nos folículos pré-ovulatórios, e através de imunohistoquímica, se confirmou a presença de receptores TrkA nas células do cúmulo. A estimulação com NGF (100 ng/mL) *in vitro*, induziu a expansão das células do cúmulo, e o desacoplamento com as células da teca (redução da TZP), além da retomada da meiose em mais de 70% dos ovócitos analisados, corroborando com a participação da Beta-NGF na maturação do ovócito (BARBONI et al., 2002). Em suínos, analisou-se o efeito da suplementação com NGF durante a maturação e a fertilização *in vitro*, e a taxa de blastocistos gerados, através de cultivo de CCOs com NGF (1 ng/mL). Após 30h, uma maior proporção de ovócitos tratados com NGF atingiu o estágio de meiose II, mas após 40h, não houve diferença de proporção entre os grupos, simbolizando que a suplementação com NGF durante a maturação *in vitro* acelera a progressão nuclear (PAPP et al., 2005).

Dado o exposto, tem-se que a suplementação do meio de maturação *in vitro* seria uma alternativa para melhorar os resultados de PIVEs, sejam realizadas de forma comercial ou acadêmica, pois os resultados encontrados neste estudo demonstraram taxas estatisticamente maiores ($p < 0,05$) na formação de clivagens e blastocistos entre grupos de ovócitos expostos

à suplementação com Beta-NGF durante o processo de maturação *in vitro*. Entretanto, o anticorpo utilizado neste trabalho foi o anti-Pan Trk, sendo capaz de se ligar aos receptores TrkA, TrkB e TrkC. Os receptores TrkB e suas respectivas neurotrofinas (fator neurotrófico derivado do cérebro e N4) também foram identificados em ovários bovinos (SILVA et al., 2005), dessa forma, seria viável em estudos futuros realizar a quantificação dos três tipos de receptores no CCO, analisando a proporção de cada receptor.

8. CONCLUSÃO

O presente estudo comprovou a presença em bovinos de receptores de Beta-NGF (Trk e p75) em ovócitos imaturos e em células do cúmulo do complexo cúmulo ovócito (CCO). Também pode-se verificar que a suplementação do meio de maturação ovocitária, na produção *in vitro* de embriões bovinos, leva a melhores taxas de clivagem e formação de blastocistos. Conclui-se então que a suplementação do meio de maturação ovocitária com Beta-NGF seria uma alternativa para melhorar os resultados de PIVEs bovinas, em rotinas de cunho comercial ou acadêmico.

9. REFERÊNCIAS

- ADAMS, G.P.; RATTO, M.H.; HUANCA, W.; SINGH, J. Ovulation-Inducing Factor in the Seminal Plasma of Alpacas and Llamas. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 3, p.452-457, 2005. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.105.040097>.
- EL ALLALI, K.; EL BOUSMAKI, N.; AINANI, H.; SIMONNEAUX, V. Factor/β-NGF: A Kisspeptin Target Hypothesis. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 4, p.99-111, 2017. <http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2017.00099>.
- BARBONI, B.; MATTIOLI, M.; GIOIA, L.; TURRIANI, M.; CAPACCHIETTI, G.; BERARDINELLI, P.; BERNABÒ, N. Preovulatory rise of NGF in ovine follicular fluid: Possible involvement in the control of oocyte maturation. **Microscopy Research and Technique**, v. 59, n. 6, p.516-521, 2002. <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.10230>.
- BAZER, F.W.; SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; BURGHARDT, R.C.; WU, G. Comparative aspects of implantation. **Reproduction**, v. 138, n. 2, p.195-209, 2009. <http://dx.doi.org/10.1530/REP-09-0158>
- BIBEL, M. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. **The Embo Journal**, v. 18, n. 3, p.616-622, 1999. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/18.3.616>.
- BUENO, A. P.; BELTRAN, M. P. Produção in vitro de embriões bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 11, p.1-7, 2008.
- CARRIERO, F.; CAMPIONI, N.; CARDINALI, B.; PIERANDREI-AMALDI, P. Structure and expression of the nerve growth factor gene in Xenopus oocytes and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 29, n. 4, p.313-322, 1991. [Http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1080290402](http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1080290402).
- CHAVES, R.N.; ALVES, A.M.; LIMA, L.F.; MATOS, H.M.; RODRIGUES, A.P.; FIGUEIREDO, J.R. Role of nerve growth factor (NGF) and its receptors in folliculogenesis. **Zygote**, v. 21, n. 2, p.187-197, 1 2012. <http://dx.doi.org/10.1017/s0967199412000111>.
- COLAZO, M. G.; MAPLETOFT, R. J. Fisiología del Ciclo Estral Bovino. **Revista Ciencias Veterinarias**, v. 16, n. 2, p.31-46, 2014. <http://dx.doi.org/10.19137/cienvet2014-1623>
- CRISPO, M.; DOS SANTOS-NETO, P.C.; VILARIÑO, M.; MULET, A.P.; DE LEÓN, A.; BARBEITO, L.; MENCHACA, A. Rapid Communication: Nerve growth factor influences cleavage rate and embryo development in sheep. **Journal of animal science**, v. 94, n. 10, p.4447-4451, 2016. <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2016-0736>

CUNHA, J. M.; SANTOS, K.H.S.; AMORIM, A.R.; NEVES NETO, J.T.; DALL'ACQUA, P.C. Aspectos fisiológicos do ciclo estral em bovinos. In: IV Colóquio estadual de pesquisa multidisciplinar, 2019, Mineiros/GO, **Anais Colóquio Estadual de Pesquisa Multidisciplinar**, p. 1 – 2, 2019

FENG, Y.; TAMADON, A.; HSUEH, A. J. W. Imaging the ovary. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 36, n. 5, p.584-593, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.02.006>.

FORDE, N.; BELTMAN, M.E.; DUFFY, G.B.; DUFFY, P.; MEHTA, J.P.; O'GAORA, P.; ROCHE, J.F.; LONERGAN, P.; CROWE, M.A. Changes in the Endometrial Transcriptome During the Bovine Estrous Cycle: Effect of Low Circulating Progesterone and Consequences for Conceptus Elongation. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 2, p.266-278, 2010. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.110.085910>.

GALIMBERTI, A.M.; FONSECA, F.A.; ARAUJO, M.C.C.; COSTA, E.P.; FREITAS, C.; GUIMARÃES, J.D.; FERREIRA, A.M. Taxa de gestação e níveis plasmáticos de progesterona, em receptoras de embrião bovino, tratadas com buserelina após a inovulação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 2, p.353-359, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982001000200009>

GARCIA, S. M. Avaliação da taxa de blastocisto e prenhez de embriões produzidos in vitro em decorrência da contagem de folículos antrais em vacas da raça Girolando. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 15, n. 2, p.67-67, 2017. <http://dx.doi.org/10.7213/academica.15.s02.2017.33>.

GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M.M.; VISINTIN, J.A.; COSTA, L.F.S. Produção in vitro de Embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2. ed. [s. L.]: Roca, 2008. Cap. 14. p. 261-289.

IDREES, M.; XU, L.; SONG, S.H.; JOO, M.D.; LEE, K.L.; MUHAMMAD, T.; EL SHEIKH, M.; SIDRAT, T.; KONG, I.K. PTPN11 (SHP2) Is Indispensable for Growth Factors and Cytokine Signal Transduction During Bovine Oocyte Maturation and Blastocyst Development. **Cells**, v. 8, n. 10, p.1272-1295, 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/cells8101272>.

JANA, B.; KOSZYKOWSKA, M.; CZARZASTA, J. Expression of Nerve Growth Factor and Its Receptors, TrkA and p75, in Porcine Ovaries. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, n. 4, p.468-474, 2011. <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.10-180h>

LI, C.; SUN, Y.; YI, K.; MA, Y.; SUN, Y.; ZHANG, W.; ZHOU, X. Detection of nerve growth factor (NGF) and its specific receptor (TrkA) in ejaculated bovine sperm, and the effects of NGF on sperm function. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p.1615-1622, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.033>.

LIMA, L. F.; BRUNO, J.B.; SILVA, A.M.S.; DUARTE, A.B.G.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Importância das comunicações intercelulares para o desenvolvimento de folículos ovarianos. **Reprodução & Climatério**, v. 31, n. 2, p.93-104, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.recli.2015.12.005>.

MAYERHOFER, A.; DISSEN, G.A.; PARROTT, J.A.; HILL, D.F.; MAYERHOFER, D.; GARFIELD, R.E.; COSTA, M.E.; SKINNER, M.K.; OJEDA, S.R. Involvement of nerve growth factor in the ovulatory cascade: trkA receptor activation inhibits gap junctional communication between thecal cells. **Endocrinology**, v. 137, n. 12, p.5662-5670, 1996. <http://dx.doi.org/10.1210/endo.137.12.8940397>.

MELLO, R.R.C.; FERREIRA, J.E.; SOUSA, S.L.G.; MELLO, M.R.B.; PALHANO, H.B. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 2, p.58-64, 2016.

NEBREDÁ, A.R.; MARTIN-ZANCA, D.; KAPLAN, D.R.; PARADA, L.F.; SANTOS, E. Induction by NGF of meiotic maturation of *Xenopus* oocytes expressing the trk proto-oncogene product. **Science**, v. 252, n. 5005, p.558-561, 1991. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1850550>.

PAN, Y.; WANG, M.; BALOCH, A.R.; ZHANG, Q.; WANG, J.; MA, R.; XU, G.; KASHIF, J.; WANG, L.; FAN, J.; CUI, Y.; YU, S. FGF10 enhances yak oocyte fertilization competence and subsequent blastocyst quality and regulates the levels of CD9, CD81, DNMT1, and DNMT3B. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 10, p.17677-17689, 2019. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.28394>.

PAPP, A.B.; SOMFAI, T.; TARTAGLIONE, M.; VARGA, E.; GARDON, J.C. The effect of nerve growth factor on nuclear progression of porcine oocytes during in vitro maturation and embryo development. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 53, n. 1, p.91-101, 2005. <http://dx.doi.org/10.1556/avet.53.2005.1.9>.

PINHEIRO, P. Md.saúde (Ed.). **Processo de evolução**. 2019. Disponível em: <<https://www.mdsaude.com/ginecologia/ovulacao/>>. Acesso em: 18 jan. 2020.

PIÑÓN, L.G.; MINICHIELLO, L.; KLEIN, R.; DAVIES, A.M. Timing of neuronal death in trkA, trkB and trkC mutant embryos reveals developmental changes in sensory neuron dependence on Trk signalling. **Development**, v.122, n.10, p.3255-3261, 1996.

RATTO, M.H.; BERLAND, M.A.; SILVA, M.E.; ADAMS, G. New insights of the role of β -NGF in the ovulation mechanism of induced ovulating species. **Reproduction**, v.157, n. 5, p.199-207, 2019. <http://dx.doi.org/10.1530/REP-18-0305>.

REN, L.; MEDAN, M.S.; WENG, Q.; JIN, W.; LI, C.; WATANABE, G.; TAYA, K. Immunolocalization of Nerve Growth Factor (NGF) and Its Receptors (TrkA and p75LNGFR) in the Reproductive Organs of Shiba Goats. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 3, p.399-404, 2005. <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.16082>.

RETAMALES-ORTEGA, R.; ORÓSTICA, L.; VERA, C.; CUEVAS, P.; HERNÁNDEZ, A.; HURTADO, I.; VEJA, M.; ROMERO, C. Role of Nerve Growth Factor (NGF) and miRNAs in Epithelial Ovarian Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p.507-524, 2017. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18030507>.

SANTOS, K.J.G.; SANTOS, A.P.P.; COSTA, M.A.; MONTESINOS, I.S. Biotecnologias reprodutivas e fisiologia reprodutiva da fêmea bovina – conhecimento para o sucesso. **Pubvet**, v. 6, n. 36, p.1478-1478, 2012.

SCANZANI, M. **Expansão do cumulus oophorus de oócitos bovinos maturados in vitro na presença de fosfatidilcolina ou ácido linoleico conjugado**. 2013. 48 f. Monografia (Especialização) - Curso de Biologia, Biologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

SHI, Z.; JIN, W.; WATANABE, G.; SUZUKI, A.K.; TAKAHASHI, S.; TAYA, K. Expression of Nerve Growth Factor (NGF), and Its Receptors trkA and p75 in Ovaries of the Cyclic Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*) and the Regulation of Their Production by Luteinizing Hormone. **Journal of Reproduction and Development**, v. 50, n. 6, p.605-611, 2004. <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.50.605>.

SILVA, R. T. **Proteoma nuclear e micro-RNAs de espermatozoides de bovinos férteis e subférteis**. 2018. 79 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/mg, 2018.

SILVA, S. J. M. et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes bovine oocyte cytoplasmic competence for embryo development. **Reproduction**, v. 129, n. 4, p.423-434, abr. 2005. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/rep.1.00471>.

SOARES, P. H. A.; JUNQUEIRA, F. S. Particularidades reprodutivas da fêmea bovina: Revisão. **Pubvet**, v. 13, n. 1, p.1-6, 2019. <http://dx.doi.org/10.31533/pubvet.v13n02a257.1-6>.

STEWART, J.L.; MERCADANTE, V.R.G.; DIAS, N.W.; CANISSO, I.F.; YAU, P.; IMAI, B.; LIMA, F.S. Nerve Growth Factor-Beta, purified from bull seminal plasma, enhances corpus luteum formation and conceptus development in *Bos taurus* cows. **Theriogenology**, v. 106, p.30-38, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.007>.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, 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**, v. 64, n. 3, p.904-909, 2001. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>.

TAN, J.; ZOU, Y.; HUANG, Z.H.; ZHANG, Z.Q.; WU, L.P.; WU, X.W.; WAN, X.J.; XIN, C.L.; WU, Q.F. C-kit signaling promotes human pre-implantation 3PN embryonic development and blastocyst formation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.17, n. 1, p.75-75, 2019. <http://dx.doi.org/10.1186/s12958-019-0521-8>.

VALLE, E. R. **O ciclo estral de bovinos e métodos de controle**. Campo Grande/ms: Embrapa-cnpgc, 1991. 33 p.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p.100-109, 2008.

VIANA, J. H. M. **Classificação de embriões bovinos produzidos in vivo**. Comunicado Técnico 59, Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2009, 4p.

YAMAMOTO, M.; SOBUE, G.; YAMAMOTO, K.; TERAOKA, S.; MITSUMA, T. Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. **Neurochemical Research**, v.21, n. 8, p.929-938, 1996. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02532343>.