

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**EXPRESSÃO DAS MAPKs EM FOLÍCULOS OVARIANOS E
CORPOS LUTEOS EM DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL DE
BOVINOS**

Aluna: Mônica Rodrigues Ferreira
ORIENTADOR: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves Araújo

GOIÂNIA
2009

MÔNICA RODRIGUES FERREIRA

**EXPRESSÃO DAS MAPKs EM FOLÍCULOS OVARIANOS E
CORPOS LUTEOS EM DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL DE
BOVINOS**

Tese apresentada para obtenção do grau de
Doutor em Ciência Animal junto à Escola de
Veterinária da Universidade Federal de
Goiás

Área de Concentração:

Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

Orientador:

Prof. Dr. Eugênio Gonçalves Araújo – UFG

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. João Francisco Coelho de Oliveira - UFSM

Prof^a. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis – UFG

GOIÂNIA

2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

Ferreira, Mônica Rodrigues.

F383e Expressão das MAPKs em folículos ovarianos e corpos lúteos em diferentes fases do ciclo estral de bovinos [manuscrito] /Mônica Rodrigues Ferreira. – 2009. xvii, 86f. : il., figs.,qds.

**Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves Araújo;
Coorientadores: Prof. Dr. João Francisco Coelho de Oliveira, Profª Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis**

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2009.

Bibliografia.

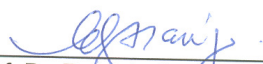
Inclui lista de figuras e quadros

1. Bovinos – Ciclo estral 2. Folículos ovarianos – Bovinos 3. Luteólise I. Título.

CDU: 619: 636.2:611.651

MÔNICA RODRIGUES FERREIRA

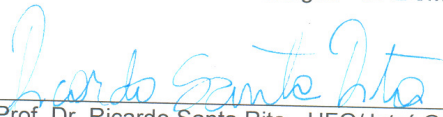
Tese defendida e aprovada em **21/08/2009** pela Banca Examinadora
constituída pelos professores:



Prof. Dr. Eugênio Gonçalves De Araújo
(ORIENTADOR (A))



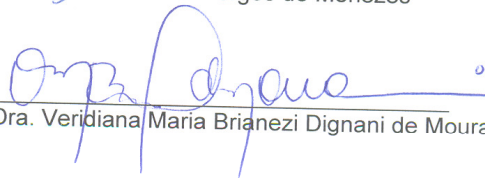
Prof. Dr. Luis David Solis Murgas - UFLA/MG



Prof. Dr. Ricardo Santa Rita - UFG/Jataí-GO



Profa. Dra. Liliانا Borges de Menezes



Profa. Dra. Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura

“Há uma estrada de pedra que passa na fazenda
É teu destino, é tua senda, onde nascem tuas as canções.
As tempestades do tempo que marcam tua história
Fogo que queima na memória e acende os corações”

Paula Fernandes e Maurício Santini

AGRADECIMENTOS

Tantas pessoas a agradecer e tão pouco espaço. Primeiramente a Deus, provedor de minha vida e que todo dia me mostra maneiras diferentes de crescer e me tornar uma pessoa melhor.

Ao meu pai que é minha vida e que me deu amor, carinho e suporte todos estes anos para que eu seguisse sua carreira e meu sonho.

A minha mãe, fonte de amor incondicional e que sempre foi para mim um exemplo de força e dedicação.

Ao meu chefinho querido Eugênio, pessoa que sempre me deu apoio incondicional e acreditou em mim. Hoje meu amigo e pai com o qual sei que sempre poderei contar.

Ao Thiago, pessoa especial que sempre me surpreende e que me dá suporte em muitos momentos difíceis.

Minhas irmãs, que sempre tem uma sabedoria a dividir.

A Patrícia Almeida Machado, minha xuxuzinha estagiária, meu muito obrigado pelas várias horas dentro do laboratório.

Ao laboratório de histologia e patologia pelo auxílio durante todo o experimento.

A todos os meus amigos, os novos e os velhos, os que estão perto ou longe, muito obrigada.

Dra. Ana Paula Kipnis e Dr. João Francisco Coelho de Oliveira, meus co-orientadores, obrigada pela atenção.

À banca de qualificação, pelo tempo dispensado e apontamentos, tão pertinentes para melhoramento da tese.

Ao CNPq pelo apoio financeiro e a bolsa cedida.

INDICE

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
1.2 - CICLO ESTRAL DE BOVINOS E FOLICULOGÊNESE.....	5
1.2 - CORPO LÚTEO E LUTEÓLISE.....	9
1.3 - CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS MAPKs (PROTEÍNAS ATIVADAS POR MITÓGENOS)	13
1.4 - RELAÇÃO ENTRE AS MAPKs E O CICLO ESTRAL BOVINO (FOLICULOGÊNESE, DESENVOLVIMENTO E MORTE DO CORPO LÚTEO)... ..	17
1.4.1 – MAPKs e foliculogênese.....	17
1.4.2 – MAPKs e o corpo lúteo.....	21
2 - OBJETIVOS.....	23
3 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
CAPÍTULO 2 – A ATIVIDADE DE MEK 1/2 E ERK 1/2 EM FOLÍCULOS OVARIANOS “IN VIVO” É DEPENDENTE DO TIPO FOLICULAR E DA FASE DO CICLO ESTRAL EM BOVINOS.....	34
2.1 – INTRODUÇÃO	37
2.2 - MATERIAIS E MÉTODOS	39
2.3 - RESULTADOS.....	41
2.3.1 - Folículos pré antrais	41
2.3.2 - Folículos primordiais ativados e primários	42
2.3.3 – Folículos secundários.....	43
2.3.4 - Folículos terciários	44
2.3.5 - Folículos antrais	45
2.4-DISCUSSÃO.....	46
2.5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
CAPÍTULO 3 - A ATIVAÇÃO DE MAP QUINASES EM DIFERENTES ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO ESTÁ ASSOCIADA À SOBREVIVÊNCIA DO CORPO LÚTEO EM BOVINOS.....	56
3.1-INTRODUÇÃO	58
3.2-MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
3.3-RESULTADOS.....	62
3.3.1-COX-2	62
3.3.2-MEK 1/2	62

3.3.3-ERK 1/2.....	62
3.3.4-Bcl-2.....	63
3.3.5-Relação entre a ativação da fosforilação da cascata mek/erk 1/2 pela cox-2 e diminuição dos índices de Bcl-2.....	63
3.4-DISCUSSÃO.....	65
3.5-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
CAPITULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografias dos tipos foliculares presentes no parênquima ovariano de um bovino adulto.	7
Figura 2- Diagrama esquemático das ondas foliculares que ocorrem durante o ciclo estral bovino, cujos hormônios FSH, LH e progesterona apresentam papel importante no controle da foliculogênese, ovulação e manutenção do corpo lúteo, respectivamente.	8
Figura 3 – Controle neuroendócrino da luteólise, baseado na literatura de McCracken et al., 1999.	12
Figura 4 – desenho esquemático da ativação seqüencial da cascata das MAPKs, via fosforilação, demonstrando a sinalização molecular capaz de ativar cada umas das famílias.	14
Figura 5 - Representação esquemática da via de transdução de sinal da família , MEK/ERK 1/2, via proteínas adaptadoras que mediam a ligação entre os RTK e o Sos.	15
2 – A atividade de MEK 1/2 e ERK 1/2 em folículos ovarianos “in vivo” é dependente do tipo folicular e da fase do ciclo estral em bovinos	34
Figura 1 – Frequência de marcação da MEK e ERK1/2, em diferentes fases de ciclo estral. As barras pretas e brancas ilustram a frequência de marcação da MEK e ERK 1/2, respectivamente, nos diferentes grupos, sendo que letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).	41
Figura 2 – Frequência de marcação da MEK e ERK1/2, em diferentes fases de ciclo estral. As barras pretas e brancas ilustram a frequência de marcação da MEK e ERK 1/2, respectivamente, nos diferentes grupos, sendo que letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).	42
Figura 3 - Frequência de marcação da MEK e ERK1/2, em diferentes fases de ciclo estral. As barras pretas e brancas ilustram a frequência de marcação da MEK e ERK	

1/2, respectivamente, nos diferentes grupos, sendo que letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).	43
Figura 4 - Gráfico ilustrando a freqüência de marcação da MEK e ERK1/2, em diferentes fases de ciclo estral. As barras pretas e brancas ilustram a freqüência de marcação da MEK e ERK 1/2, respectivamente, nos diferentes grupos, sendo que letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).	44
Figura 5 - Gráfico ilustrando a freqüência de marcação da MEK e ERK1/2, em diferentes fases de ciclo estral. As barras pretas e brancas ilustram a freqüência de marcação da MEK e ERK 1/2, respectivamente, nos diferentes grupos, sendo que letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).	45
Figura 6 - Gráfico ilustrando a freqüência de marcação da MEK e ERK1/2, em diferentes fases de ciclo estral. As barras pretas e brancas ilustram a freqüência de marcação da MEK e ERK 1/2, respectivamente, nos diferentes grupos, sendo que letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).	46
Figura 7 – Fotomicrografia das classes foliculares estudadas em diferentes fases do ciclo estral de bovinos, seguidos dos controles negativos da reação de imunistoquímica.	47
3 - A ativação de map quinases em diferentes etapas de desenvolvimento está associada à sobrevivência do corpo lúteo em bovinos	56
Figura 1: Comparação das médias de intensidade de marcação da COX-2 e Bcl-2 nos diferentes grupos experimentais estudados, calculado após normalização dos dados, por análise de variância.	64
Figura 2: Comparação das médias de intensidade de marcação da MEK 1/2 e ERK 1/2 nos diferentes grupos experimentais estudados, calculado após normalização dos dados, por análise de variância.	65

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Quantidade dos diferentes tipos foliculares contados, em diferentes fases do ciclo estral, durante o experimento.	40
--	----

LISTA DE ABREVIATURA

3 β -HSD	3 β hidroxisteroide dehidrogenase
Akt	Proteína quinase B
BAD	Gene antagonista da morte celular
Bcl-2	Oncogene associado a linfoma/leucemia de células B
CLG	Células luteais grandes
CLP	Células luteais pequenas
COX-2	Ciclooxigenase 2
ECG	Gonadotrofina coriônica eqüina
EGF	Fator de crescimento epidermal
ERK1/2 (p42 e p44)	Extra regular quinase 1/2
ERK5 (BMK)	Extra regular quinase 5
FSH	Hormônio folículo estimulante
GDP	Guanosina di fosfato
GH	Hormônio do crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GTP	Guanosina tri fosfato
HFPR	Receptores de prostaglandina de alta afinidade
IGF-I	Fator de crescimento semelhante a insulina
JAK	Janus quinase
JNK	Jun N-terminal Kinase
LFPR	Receptores de prostaglandina de baixa afinidade
LH	Hormônio luteinizante
MAP2K (MEK1/2)	Proteína quinase quinase

MAP3K (MEKK ou MAPKKK)	Proteína quinase quinase quinase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCF-7	Células de carcinoma humano de mama
MCP – 1	Proteína quimiotática de monócito 1
P38	MAPK P38
P ₄	Progesterona
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PGF ₂ α	Prostaglandina F 2 α
PKA	Proteína quinase A
PKB/Akt	Proteína quinase B
PKC	Proteína quinase C
PLA ₂	Fosfolipase A 2
RTK	Receptor tirosino quinase
SFC	Fator de células tronco
Sgk	Quinase regulada por glicocorticóides
Shc, Grb2	Proteínas de adaptação
VEGF A	Fatos de crescimento endotelial vascular A

RESUMO

A ocorrência do ciclo estral bovino, a partir de variações dos hormônios do eixo-hipotálamo-hipófise-gônadas, ativa as vias das MAPKs (proteína ativada por mitógenos). O objetivo desta tese foi avaliar *in vivo* a frequência de expressão da forma ativa (fosforilada), de todos os tipos foliculares ovarianos e corpo lúteo para p-MEK 1/2 e p-ERK1/2, em diferentes fases do ciclo estral de bovinos. Para tal, foram coletados em abatedouros locais ovários de bovinos e determinada a fase do ciclo estral, caracterizando sete fases, definidas como grupos experimentais: dias 1-3 (n=2), 4-6 (n=5), 7-9 (n=5), 10-12 (n=3), 13-15 (n=5), 16-18 (n=5) e 19-21 (n=5). Após o processamento histológico os cortes foram submetidos à imunistoquímica, utilizando anticorpos que reconhecem especificamente a forma fosforilada da MEK 1/2 e ERK 1/2. Cortes histológico que apresentavam corpos lúteos foram submetidos ainda a imunistoquímica com anticorpos que reconhecem p-BCL2 (fosfo células B de linfoma 2) e COX-2 (ciclooxigenase 2). As frequências de folículos marcados foram avaliadas em relação à presença ou não de marcação celular para as duas enzimas. Já os fragmentos de corpo lúteo foram avaliados de acordo com escores de intensidade de marcação para os quatro anticorpos. As frequências das marcações nos folículos estudados foram comparadas por meio do teste qui-quadrado. Em folículos pré-antrais, tanto a MEK quanto a ERK 1/2 apresentaram níveis elevados entre os dias 16 a 18. No caso da p-MEK, a maior ativação dos folículos primordiais e primários ocorreu entre os dias 7 a 9. Em folículos secundários, a menor presença de folículos marcados para p-MEK ocorreu no grupo 4 a 6. Os níveis de p-ERK começaram a se elevar a partir de 13 a 15 dias, e posteriormente diminuíram. Quando comparadas as frequências de MEK e ERK, foram registradas diferenças ($p < 0,0001$) nos folículos antrais em comparação aos demais tipos foliculares. Concluiu-se que a intensidade de ativação das MAPKs MEK/ERK varia de acordo com as fases do ciclo estral e com a classe folicular estudada. Já os corpos lúteos foram avaliados por meio de análise de variância, após transformação dos dados, na qual foi observada que as proteínas estudadas apresentam variação no perfil de

expressão, estando relacionada com o desenvolvimento, sobrevivência e morte do corpo lúteo. Sendo que o COX-2, um precursor da prostaglandina, tem capacidade de ativar as vias das MEK/ERK 1/2, diminuindo a frequência de expressão do fator de sobrevivência celular BCL-2, levando o corpo lúteo ao momento da luteólise. Assim a avaliação do perfil de ativação das MAPKs *in vivo*, sem a utilização de protocolos hormonais, demonstrou a importância desta via enzimática durante o processo fisiológico reprodutivo, abrindo espaço para futuras indagações e possibilidades de ampliação de conhecimento a cerca do funcionamento hormonal e sua associação com os mecanismos celulares ativados pelos hormônios.

Palavras-chaves: MEK 1/2, ERK 1/2, foliculogênese, luteólise

ABSTRACT

Bovine estrous cycle activates the pathways of MAPKs (mitogen activated protein) via oscillation of hypothalamus-pituitary-gonad axis hormones. The objective of this work was to evaluate *in vivo* the frequency of expression of active (phosphorylated) form, of p-MEK 1/2 and p-ERK1/2 in all types of ovarian follicles and corpora lutea in different phases of the estrous cycle of cattle. Bovine ovaries were harvested in a local slaughterhouse and the phase of the estrous cycle was determined, considering seven stages, defined as experimental groups: days 1-3 (n = 2), 4-6 (n = 5), 7-9 (n = 5), 10-12 (n = 3), 13-15 (n = 5), 16-18 (n = 5) and 19-21 (n = 5). After processing, the histological sections were subjected to immunohistochemistry using antibodies that specifically recognize the phosphorylated form of MEK 1/2 and ERK 1/2. Histological sections containing *corpora lutea* were also subjected to immunohistochemistry with antibodies that recognize p-BCL2 (B cell phospho lymphoma 2) and COX-2 (COX-2). The frequency of marked follicles was evaluated for the presence or absence of markup for the two cellular enzymes. The fragments of the corpus luteum were evaluated according to the scores of intensity for positive staining of the four antibodies. The frequencies of the markers studied in the follicles were compared using the chi-square. In preantral follicles, both MEK and ERK 1/2 showed high levels between 16 to 18 days. In the case of p-MEK, the greater activation of primordial follicles and primary held from 7 to 9. In secondary follicles, the less marked for p-MEK occurred in group 4 to 6. Levels of p-ERK began to rise from 13 to 15 days and subsequently decreased. Comparing the frequencies of MEK and ERK, there was statistic difference ($p < 0.0001$) in antral follicles compared to other types of follicles. It was concluded that the intensity of activation of MAPKs MEK / ERK varies with the phases of the estrous cycle and follicular class studied. Since the *corpora lutea* were evaluated by analysis of variance after transforming the data, it was observed that the proteins studied showed variation in expression profile, in relation to the development, survival and death of the corpus luteum. Since COX-2, a precursor of prostaglandin, is capable of activating the pathways of MEK / ERK 1/2, it reduces the frequency of expression of cell survival

factor BCL-2, leading to the corpus luteum at luteolysis. The *in vivo* evaluation of the activation profile of MAPKs without the use of hormonal protocols demonstrated the importance of this enzyme during the physiological reproductive process, raising new inquiries and providing opportunities to expand knowledge about the functioning of the hormone and its association with the cellular mechanisms activated by hormones.

Key words: MEK 1/2, ERK 1/2, folliculogenesis, luteolysis