



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ**

**JULIANA VIEIRA LUZ**

**IDENTIFICAÇÃO DO RECEPTOR CD44 EM OÓCITOS E EMBRIÕES  
OVINOS (*Ovis aries*)**

**FORTALEZA – CEARÁ**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**JULIANA VIEIRA LUZ**

**IDENTIFICAÇÃO DO RECEPTOR CD44 EM OÓCITOS E EMBRIÕES  
OVINOS (*Ovis aries*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

**Área de Concentração:** Reprodução e Sanidade Animal.

**Linha de Pesquisa:** Reprodução e sanidade de pequenos ruminantes.

**Orientador:** Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas.

**FORTALEZA – CEARÁ**

**2008**

L979i Luz, Juliana Vieira

Identificação do receptor CD44 em oócitos e embriões ovinos (*Ovis aries*). \_\_\_\_Fortaleza, 2008.  
66 p.; il.

Orientador: Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1. Ovinos. 2. Oócitos. 3. Embriões. 4. Moléculas de adesão. 5. CD44. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 636.3

Identificação do receptor CD44 em oócitos e embriões ovinos (*Ovis aries*)

Juliana Vieira Luz

Dissertação aprovada em: 15/08/2008.

Conceito obtido: Satisfatório.

Nota obtida: 9,5.

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas  
Orientador - UECE

---

Profa. Dra. Luciana Magalhães Melo  
Co-orientadora - UECE

---

Prof. Dr. José Luiz Rodrigues  
Examinador - UFRGS

---

Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro  
Examinadora - UECE

---

Prof. Dr. Dárcio Ítalo Alves Teixeira  
Co-orientador - UECE  
(suplente)

*A riqueza de um relato não está só na habilidade de quem o escreve,  
Mas talvez na experiência herdada por quem o lê.  
Robert Louis Stevenson  
(escritor escocês)*

*Aos meus pais pela sabedoria, orientação e apoio sempre incondicional,  
Ao meu esposo Paulo pelo companheirismo, compreensão e amor.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, obrigado por ter me dado coragem e proteção para enfrentar os momentos mais difíceis, saúde durante toda esta trajetória e discernimento para ir ao encontro das pessoas bondosas e amigas que surgiram no meu caminho.

Ao meu querido esposo, Paulo Santos de Andrade, amigo e companheiro, pela presença constante, carinho e confiança. Pela sua cumplicidade e amor, compreendeu e acompanhou todos os passos.

A você meu Pai, Francisco Marcelo Teixeira Luz, meu incentivador permanente, que sempre ensinou aos seus que a herança mais valiosa que se deixa para um filho é a formação do seu caráter e educação.

À minha mãezinha, Maria Júlia Vieira Teixeira Luz, com sua doçura, garra e fé inabalável nas tantas vezes em que pediu a Deus, e ainda pede, pela saúde, felicidade e sucesso de seus filhos.

Aos meus irmãos, Marcelo, Renata e Carolina Vieira Luz, amigos indispensáveis, pelo carinho, força e por todas as vezes que precisei de uma palavra de conforto.

Aos meus sogros, Aldir Francisco de Andrade e Wanda Santos de Andrade, pelas inúmeras vezes em que precisei da ajuda de vocês e por me fazer sentir uma filha, ainda que torta, muito amada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas. O que eu disser será pouco para demonstrar a minha gratidão pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por ter sido acolhida com muito carinho no LFCR. Obrigada pela amizade, por acreditar, confiar no meu potencial e tornar concreta a realização deste sonho. Agradeço por tudo que aprendi com seus ensinamentos sobre reprodução, pelo seu exemplo de dedicação a pesquisa e por ser parte responsável na minha formação profissional.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Luciana Magalhães Melo, pela sua amizade, seu exemplo de paixão pela pesquisa, por me ensinar a namorar meus experimentos e me conduzir a desenvolver não apenas habilidades técnicas, mas a capacidade de solucionar problemas, interpretar resultados e tirar conclusões.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Dárcio Ítalo Alves Teixeira, pela agradável convivência diária e amizade, por sua importante participação nas colheitas cirúrgicas dos oócitos e embriões com suas “mãos abençoadas”.

Aos professores membros da banca de defesa, Prof. Dr. José Luiz Rodrigues e Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes, pela disponibilidade, valiosas sugestões e criteriosas correções dessa dissertação.

Ao amigo Agostinho Soares de Alcântara Neto, por estar comigo em todas as fases de execução dos experimentos. Essa conquista é nossa! Companheiro de tantos dias e noites de experimento, obrigada por sua dedicação, carinho e amizade.



A amiga Raylene Ramos Moura, sua amizade foi uma das maiores conquistas nesses dois anos de LFCR. Obrigada por nunca me faltar, por ter sido um porto seguro nos momentos em que precisei do seu apoio e por ser esse ser humano tão maravilhoso.

Ao amigo Felipe Crescêncio Lima pelo carinho, atenção e importante ajuda na aquisição dos animais experimentais. A amiga Dieniffer Peixoto Neves, pelo incentivo na realização desse mestrado.

A amiga e eterna companheira de CD44 Maria Luciana Lira de Andrade com quem dei meus primeiros passos nesse projeto. Você é um grande exemplo de que pessoas marcantes e especiais permanecem sempre na memória e no coração.

Aos amigos de pós-graduação, João Batista Cajazeiras, Lécio Leone de Almeida, Alexandra Fernandes Pereira, Karliely de Castro Almeida e Suely Renata Gaya Avelar pela amizade conquistada, convivência e apoio em todas etapas.

Aos demais amigos do Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, Francisco Carlos de Souza, pela amizade e companheirismo de todos os dias. Os estudantes de iniciação científica, Suyanne Alves da Cruz, Érica Souza Albuquerque, Sabrina Tainah da Cruz Silva, Camilla Rebouças Guimarães e Carlos Henrique Sousa de Melo pela colaboração, incentivo e amizade. Ao amigo Antônio César Camelo por todos os dias de agradáveis momentos de descontração. Ao Selmar Alves da Silva, grande amigo, pelo respeito, alegria das nossas brincadeiras diárias e prestatividade na realização de atividades do laboratório.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação no curso de mestrado.

Meus agradecimentos ao CNPq pela bolsa de estudos concedida e à Universidade Estadual do Ceará pela disponibilização do espaço físico para a realização do projeto.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para meu crescimento como pessoa e profissional na realização desta conquista.

## RESUMO

A família do receptor CD44 pertence ao grupo de moléculas de adesão multifuncionais amplamente expressas em muitos tipos de células e envolvidas em atividades fisiológicas como interações célula-célula e célula-matriz extracelular. Este trabalho objetivou investigar a presença do receptor CD44 em oócitos e embriões ovinos. Para tanto, oócitos imaturos foram obtidos de ovários de ovelhas adultas deslanadas provenientes de abatedouro. Oócitos maturados e embriões foram obtidos também de ovelhas adultas deslanadas submetidas a tratamento hormonal. Uma laparotomia, seguida de lavagem ovidutária ou uterina, foi realizada para obtenção dos oócitos maturados ou embriões, respectivamente. A detecção do CD44 ovino foi realizada utilizando um anticorpo monoclonal murino anti-CD44 humano e anticorpo secundário conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Linfócitos humanos e oócitos bovinos imaturos foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. A confirmação do estágio nuclear dos oócitos, bem como a classificação do estágio de desenvolvimento embrionário, foram avaliadas pelo uso do Hoechst 33342. Todas as estruturas foram avaliadas em microscópio de epifluorescência. Oócitos imaturos não apresentaram marcação fluorescente para FITC, indicando a ausência do receptor CD44. Já em oócitos maturados e embriões, foi observada fluorescência com distribuição homogênea, com maior intensidade de sinal nos primeiros. Em conclusão, em ovinos, o receptor CD44 não é expresso em oócitos antes do processo de maturação e, adicionalmente, o nível de expressão em embriões no estágio pré-implantacional é menor do que aquele em oócitos maturados.

**Palavras-chave:** moléculas de adesão, CD44, oócito, embrião, ovino.

## **ABSTRACT**

The family of the CD44 receptor belongs to the group of widely multifunctional adhesion molecules which are expressed in many types of cells and are involved in physiological activities such as cell-cell and cell-extracellular matrix interactions. This work aimed to verify the presence of CD44 receptor in both sheep oocytes and embryos. For this, immature oocytes were obtained from ovaries of hairless adult ewes at local abattoir. Also, matured oocytes and embryos were obtained of hairless adult ewes submitted to a hormonal treatment. A laparotomy, followed by oviductal or uterine flushing, was performed to recovery both matured oocytes and embryos, respectively. The sheep CD44 receptor detection was performed using a mouse monoclonal antibody anti-human CD44 and a secondary antibody conjugate to fluorescein isothiocyanate (FITC). Human lymphocytes and matured bovine oocytes were used as positive and negative controls, respectively. The verification of oocytes nuclear stage, as well as the embryo development, was made using Hoechst 33342. All structures were evaluated under epifluorescence microscopy. Immature oocytes did not shown fluorescent marking to FITC, indicating the absence of CD44 receptor. A homogeneous fluorescent distribution was observed in matured oocytes and embryos with a higher intensity in the first ones. In conclusion, in sheep, the CD44 receptor are not express in oocytes before maturation and, additionally, the expression level in preimplantational embryos is lesser than that in matured oocytes.

**Key words:** adhesion molecules, CD44, oocyte, embryo, sheep

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e/ou símbolos	01
Lista de figuras e tabelas	03
Introdução	05
1. Revisão de Literatura	06
1.1. Moléculas de adesão celular	06
1.1.1. Moléculas de adesão e reprodução	08
1.2. CD44	09
1.2.1. Definição	09
1.2.2. Estrutura	09
1.2.3. Ligantes	11
1.2.4. Funções	12
1.3. Maturação oocitária	13
1.3.1. Maturação nuclear	14
1.3.2. Maturação citoplasmática	14
1.3.3. Interação <i>cumulus</i> -oócito	15
1.4. Fecundação	16
1.5. Desenvolvimento embrionário inicial	17
2. Justificativa	20
3. Hipótese Científica	21
4. Objetivos	22
4.1. Geral	22
4.2. Específico	22
5. Capítulo 1: Detection of CD44 receptor, a cellular adhesion molecule, in sheep oocytes and embryos.	23
6. Conclusões	37
7. Perspectivas	38
8. Referências bibliográficas	39
9. Anexos	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SÍMBOLOS

AA	Aminoácido
AH	Ácido hialurônico
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumina Sérica Bovina)
Ca <sup>++</sup>	Cálcio
CAM	Cell Adhesion Molecule (Molécula de Adesão Celular)
CCO	Complexo <i>cumulus oophorus</i> -oócito
CD	Cluster of differentiation (grupamento de diferenciação)
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Solução Salina Fosfato-Tamponada de Dulbecco)
FITC	Fluorescein isothiocyanate (Isotiocianato de fluoresceína)
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Follicle Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante)
GAG	Glicosaminoglicano
GDF-9	Growth Differentiation Factor-9 (Fator-9 de Diferenciação de Crescimento)
GnRH	Gonadotrophin Releasing Hormone (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas)
h	Hora
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule (Molécula de Adesão Intercelular)
IgG	Imunoglobulina-G
IgSF	Superfamília das Imunoglobulinas
kDa	Quilodalton
LH	Luteinizing Hormone (Hormônio Luteinizante)
µg	Microgramas
µL	Microlitros
MAP	Medroxiprogesterone acetate (acetato de

	medroxiprogesterona)
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
MII	Metáfase II
min	minuto
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MUC-1	Mucina-1
MP	Membrana plasmática
NaCl	Cloreto de sódio
PBS	Phosphate Buffered Saline (Solução Salina Fosfato-Tamponada)
pFSH	Porcine Follicle Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante Suíno)
PIV	Produção <i>in vitro</i>
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucléico)
TE	Transferência de embriões
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$ (Fator de crescimento transformante- $\beta$ )
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule (Molécula de Adesão Celular Vascular)

# LISTA DE FIGURAS E TABELAS

## 1. *Lista de Figuras*

### 1.1. *Revisão de Literatura*

- Figura 1 – Exemplos de moléculas de adesão e mecanismos adesivos juncionais e não-juncionais utilizados pelas células animais na ligação com outras células e com a matriz extracelular. Adaptado de Taga e Suginami, 1998. ....pág. 06
- Figura 2 – Ilustração esquemática da estrutura protéica do CD44 evidenciando o domínio extracelular com o sítio de ligação para o AH, uma região proximal variável pela presença dos éxons variantes, o domínio transmembrana e a cauda citoplasmática. Adaptado de Ponta *et al.*, 1998.....pág. 10
- Figura 3 – Transcrito primário e RNAs mensageiros maduros do receptor CD44. O transcrito primário do CD44 contém seqüências codificadas por 20 éxons (1-10 e v1-v10). A maior e mais conhecida isoforma é a isoforma padrão (CD44s) que é amplamente expressa em vários tecidos de vertebrados em desenvolvimento e em organismos adultos. As isoformas variantes (CD44v5 a CD44v1-10) são expressas em tecidos epiteliais e células neoplásicas. Adaptação de Ponta *et al.*, 2003.....pág. 10
- Figura 4 – Esquema da maturação oocitária: formação do fuso mitótico e o núcleo em MII, o surgimento do primeiro corpúsculo polar e da matriz extracelular rica em ácido hialurônico. Adaptado de [www.academiavita.org/.../colombo&lang=english](http://www.academiavita.org/.../colombo&lang=english).....pág. 14
- Figura 5 – Esquema dos principais eventos da fecundação. Fase 1 - migração espermiática entre as células do *cumulus*; Fase 2 – dissolução da membrana acrossômica e fixação espermiática através da zona pelúcida; Fase 3 - fusão entre a membrana plasmática do oócito e o espermatozóide. Adaptado de [www.ufsm.br/blg220/hidden/disturclass.htm](http://www.ufsm.br/blg220/hidden/disturclass.htm).....pág. 17

- Figura 6 - (a) Mucinas de superfície do epitélio endometrial, tal como MUC-1 na inibição da interação do embrião-endométrio. A redução local na densidade da MUC-1 na superfície celular permite o acesso de receptores de expressão no trofotoderma. (b) Bloqueio inicial do trofotoderma aos glicanos pela mucina endometrial, seguido por interações adicionais mediadas por outros sistemas da adesão. Adaptado de Aplin, 1997.....pág. 18

## **1.2. Capítulo 1**

- Figura 1 – Detection of CD44 receptor by indirect immunofluorescence staining (FITC) in sheep oocytes and embryos. Columns show human lymphocytes (positive control, A.1-3), immature bovine oocyte (negative control, B.1-3), immature (C.1-3) and mature (D.1-3) sheep oocytes and sheep compact morula (E.1-3). Photographs of representative structures in bright field (A.1-E.1) and epifluorescence for Hoechst 33342 (A.2-E.2) and FITC (A.3-E.3).....pág. 36



## INTRODUÇÃO

A biotecnologia na área de reprodução animal apresentou um avanço substancial nas últimas décadas. A busca do aperfeiçoamento de técnicas como a transferência de embriões (TE), a produção *in vitro* de embriões (PIV) e a transgênese, além de contribuírem para o melhoramento genético e reprodutivo nas espécies de produção (Kruip e van Reenen, 2000), têm favorecido a consolidação de conhecimentos básicos sobre a fisiologia reprodutiva de várias espécies e de pequenos ruminantes em particular.

A otimização do potencial reprodutivo das fêmeas requer a compreensão mais ampla dos mecanismos que controlam o crescimento e desenvolvimento de oócitos e embriões nas suas diferentes etapas (Sirard *et al.*, 2006). Pesquisas investigando a maturação do oócito, a fecundação e o desenvolvimento embrionário são necessárias para aprimorar técnicas reprodutivas e revelar as causas de falhas reprodutivas (Thompson *et al.*, 1995).

Numerosos parâmetros fisiológicos têm sido estudados desde as etapas de maturação do oócito até a produção de blastocistos, visto que a interação entre os gametas e a subsequente fecundação são processos altamente regulados (Yanagimachi, 1994).

A compreensão dos processos reprodutivos está indiretamente relacionada com o papel desempenhado pelas moléculas de adesão celular. As moléculas de adesão são essenciais para a regulação de muitas funções celulares, e particularmente fundamentais em vários processos da reprodução (Taga & Suginami, 1998).

Acredita-se que a expressão de várias moléculas de adesão possa contribuir para as interações celulares durante o desenvolvimento de oócitos e embriões (Lu *et al.*, 2002). Dentre essas moléculas encontra-se o CD44. Este receptor de superfície celular é uma glicoproteína transmembrana expressa em vários tipos celulares incluindo leucócitos, fibroblastos, células epiteliais, queratinócitos e algumas células endoteliais (Isacke & Yarwood, 2002). O CD44 medeia interações célula-célula e célula-matriz extracelular em grande parte através da sua afinidade com o ácido hialurônico (AH) (Cichy & Puré, 2003).

Na biologia reprodutiva têm-se observado a influência do CD44 sobre a expansão do *cumulus oophorus* durante a maturação do oócito (Yokoo *et al.*, 2002), fertilidade e qualidade dos oócitos (Goodison *et al.*, 1999; Schoenfelder & Einspanier, 2003) e desenvolvimento embrionário (Goodison *et al.*, 1999, Kimura *et al.*, 2007) em diferentes espécies. Contudo, nenhum estudo foi realizado na espécie ovina. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo investigar, através de imunofluorescência indireta, a presença do receptor CD44 na superfície de oócitos e embriões desta espécie.

# 1. REVISÃO DE LITERATURA

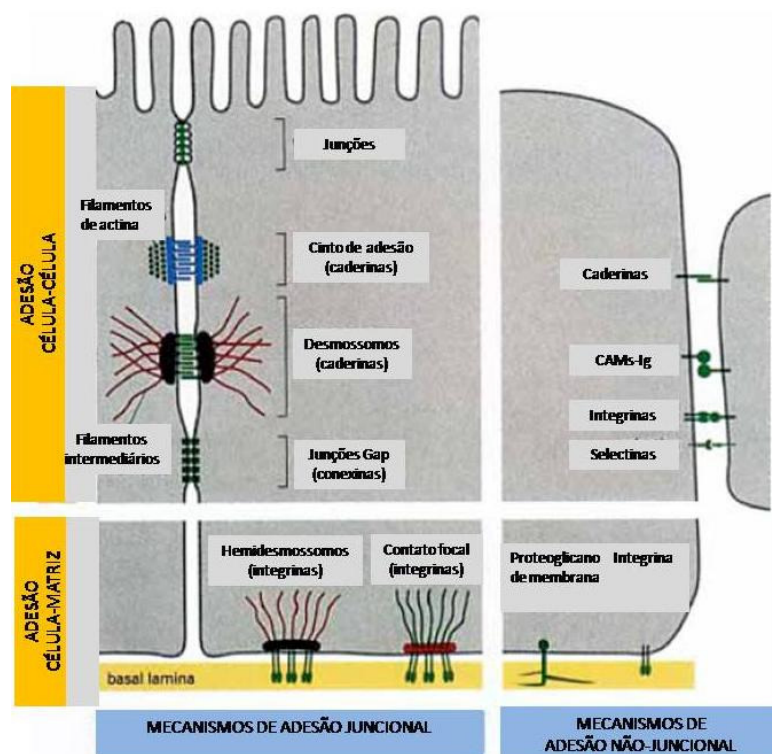
## 1.1. Moléculas de adesão celular

Moléculas de adesão celular (CAMs) são proteínas de membrana que permitem interações entre duas células e de uma célula com a matriz extracelular (MEC). Estas moléculas frequentemente atravessam a membrana e são ligadas ao citoesqueleto, de modo que a célula pode utilizá-las como meio de tração ou fixação em outras células ou na matriz extracelular. Uma molécula de adesão pode se ligar a mais de um ligante, utilizando diferentes sítios de ligação (Roitt *et al.*, 2003).

As CAMs desempenham um papel vital em numerosos processos celulares. Entre eles o crescimento celular, diferenciação, embriogênese, resposta imune, câncer e metástase, além de serem capazes de transmitir informações a partir da matriz extracelular para as células (Elangbam *et al.*, 1997). Essas interações celulares com a matriz e com outras células envolvem mecanismos adesivos tanto juncionais como não-juncionais (Fig. 1) (Taga & Suginami, 1998).

As moléculas de adesão celular podem ser classificadas em quatro grupos principais, de acordo com a sua estrutura molecular. Estes grupos incluem integrinas, caderinas, a superfamília das imunoglobulinas (IgSFs) e selectinas (Kawagishi *et al.*, 2005).

**Fig. 1** Exemplos de moléculas de adesão e mecanismos adesivos juncionais e não-juncionais utilizados pelas células animais na ligação com outras células e com a matriz extracelular. Adaptado de Taga & Suginami, 1998.



As integrinas constituem o principal grupo de moléculas de adesão, presentes em vários tipos celulares. Cada membro desta grande família de moléculas consiste em dois peptídeos ligados não-covalentemente  $\alpha$  e  $\beta$ , ambos capazes de atravessar a membrana celular. Essas moléculas enquadram-se em três principais famílias dependendo das cadeias  $\beta$  apresentadas. De forma geral as  $\beta$ 1-integrinas estão envolvidas na ligação das células à matriz extracelular, enquanto as  $\beta$ 2-integrinas estão envolvidas na adesão dos leucócitos ao endotélio ou a outras células imunes, e as  $\beta$ 3-integrinas (citoadesinas) estão envolvidas nas interações das plaquetas e neutrófilos nos sítios inflamatórios ou nos locais de dano vascular. A capacidade das integrinas em se fixar aos seus ligantes depende de cátions divalentes como o cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Roitt *et al.*, 2003).

As caderinas são proteínas de superfície celular que permitem interações celulares homofílicas cálcio-dependentes. Sua estrutura é formada por um domínio extracelular com duas a cinco seqüências repetidas de 110 aminoácidos, um domínio hidrofóbico que atravessa a membrana plasmática e dois domínios citoplasmáticos altamente conservados entre os membros desta família. Geralmente, um ou dois tipos de caderinas são expressos em uma célula e a combinação de diferentes caderinas pode criar uma maior variedade de processos adesivos entre as células (Takeichi, 1990).

A superfamília das imunoglobulinas (IgSFs) são moléculas de adesão independentes de cálcio e que estabelecem ligações homofílicas ou heterofílicas com células vizinhas (Lodish *et al.*, 2002). As glicoproteínas de membrana VCAM-1 (moléculas de adesão celular vascular) e a ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) são exemplos de moléculas de adesão que fazem parte da superfamília das imunoglobulinas. VCAM-1 é expressa em células endoteliais ativadas por citocinas, enquanto a ICAM-1 é expressa por uma variedade de células hematopoiéticas e não hematopoiéticas, incluindo células T e B, células dendríticas, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais (Elangbam *et al.*, 1997).

As selectinas receberam tal denominação para enfatizar o caráter seletivo da expressão e função destas moléculas, bem como para destacar a presença do seu domínio distal semelhante à lectina responsável pela ligação de grupos específicos de carboidratos através de ligações celulares heterofílicas dependentes do cálcio. Uma nomenclatura padrão tem sido utilizada para designar cada membro da família de acordo com o tipo celular na qual esta foi originalmente identificada: E-selectina (endotélio), P-selectina (plaquetas), e L-selectina (linfócitos) (Bevilacqua & Nelson, 1993).

### 1.1.1. Moléculas de adesão e reprodução

De forma semelhante, as moléculas de adesão tem papel em vários processos na reprodução, como na secreção pulsátil de GnRH, secreção de gonadotrofinas, desenvolvimento folicular, fecundação, desenvolvimento de embriões nas etapas de pré-implantação, implantação, placentação e durante a manutenção da prenhez (Taga & Suginami, 1998).

Nos ovários de mamíferos as CAMs estão envolvidas nas mudanças da dinâmica morfológica durante o desenvolvimento folicular ovariano e maturação. Os rearranjos celulares durante a maturação folicular ovariana são dependentes da manutenção de um contato célula-célula apropriado entre as CAMs e proteínas de membrana que se ligam ao citoesqueleto (Kawagishi *et al.*, 2005).

Durante o transporte dos gametas pelo trato reprodutivo e na etapa de interação espermatozóide-oócito, as moléculas de adesão têm sido observadas entre as células epiteliais do oviduto e a matriz extracelular do complexo *cumulus*-oócito (CCO) e no meio celular entre a membrana do espermatozóide e o revestimento extracelular do oócito (Talbot *et al.*, 2003).

O papel das CAMs no desenvolvimento embrionário é bem estabelecido e mudanças dinâmicas na sua expressão estão envolvidas na regulação da morfogênese, onde um complexo repertório de receptores de adesão celular e tecidos embrionários de expressão regulada suprem o potencial para reconhecimento e sinalização específica, desde o estágio inicial do desenvolvimento embrionário à manutenção da prenhez (Rufas *et al.*, 2000).

Apesar das caderinas terem sido relatadas como as primeiras moléculas responsáveis pela adesão célula-célula em embriões precoces de vertebrados, várias integrinas têm sido encontradas em embriões peri e pós-implantação em murinos, sugerindo que estas últimas podem ter um papel importante para o desenvolvimento embrionário (Lu *et al.*, 2002).

No processo de implantação, a mudança dos sinais do embrião para o endométrio, bem como do endométrio para o embrião nos mamíferos é altamente coordenada e envolve uma cascata de comunicações célula-célula entre o trofotoderma e o epitélio luminal (Matsumoto *et al.*, 2004). Em ovinos, entre os eventos pré-implantação ocorre o remodelamento das moléculas de adesão entre as células do epitélio luminal uterino e o trofotoderma do concepto (Johnson *et al.*, 2001).

## **1.2. CD 44**

### **1.2.1. Definição**

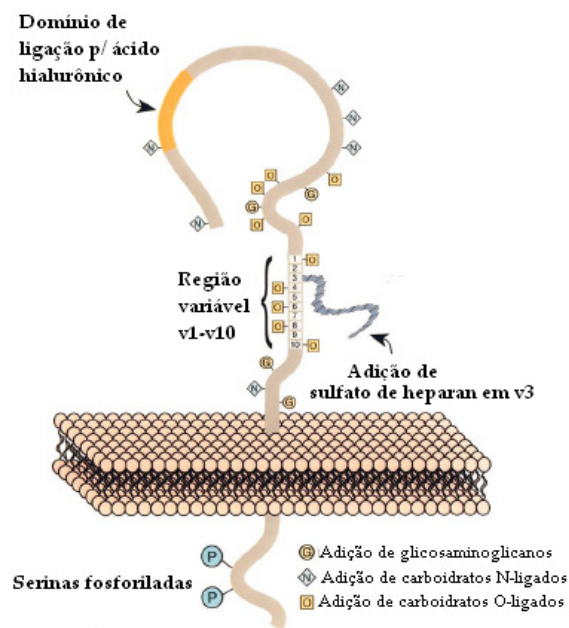
O CD44 é uma glicoproteína sulfatada ácida de membrana expressa em diversas formas pelo processo alternativo em uma variedade de tipos celulares, incluindo células T maduras, timócitos, células B, granulócitos, macrófagos, eritrócitos e fibroblastos (Abbas *et al.*, 2005). Esse receptor uma molécula de adesão multiestrutural e multifuncional (Kaneko *et al.*, 2000) envolvida nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular (Aruffo *et al.*, 1990). Essa proteína de superfície celular é dotada de uma grande versatilidade funcional, resultante da expressão de um grande grupo de glicoproteínas CD44, onde isoformas diferem nas seqüências de aminoácidos e composição de carboidratos (Turley *et al.*, 2001). Uma de suas principais características consiste em pertencer a um grande grupo de proteínas ligantes do ácido hialurônico (AH), denominadas hialaderinas (Furnus *et al.*, 2003). Muitas destas proteínas contêm uma seqüência de aminoácidos homóloga, a qual parece ser importante para a ligação com o AH (Ohta *et al.*, 1999).

### **1.2.2. Estrutura**

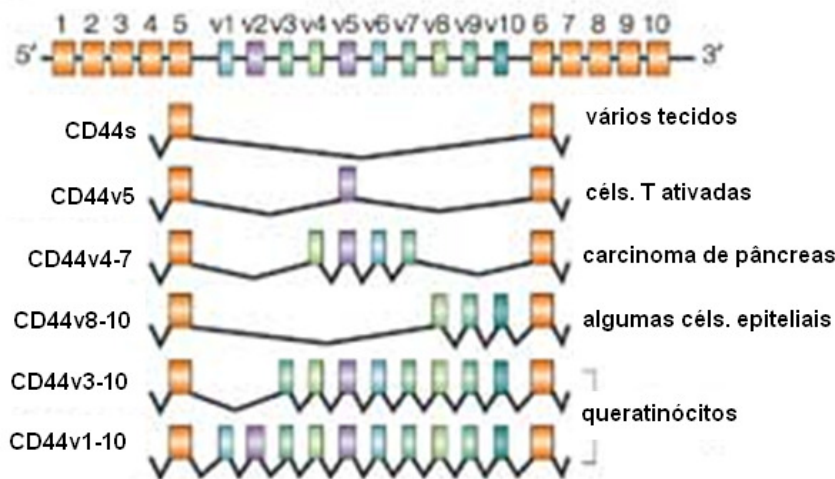
As proteínas do receptor CD44 possuem entre 80-200 kDa (Vachon *et al.*, 2006), são moléculas de cadeia única, abrangendo um domínio extracelular N-terminal, uma região proximal à membrana plasmática, um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática (Fig. 2) (Goodison *et al.*, 1999).

As proteínas CD44 são codificadas por um único gene de 20 éxons e heterogeneamente geradas por extensivos processos alternativos de corte e imenda na região extracelular, bem como por modificações pós-traducionais, incluindo a glicosilação e ligação de glicosaminoglicanos (Miyake *et al.*, 2006). Somente 10 dos éxons são normalmente expressos, codificando a forma do CD44 padrão (Kimura *et al.*, 2002). Os 10 éxons adicionais, codificados na região extracelular, são somente expressos por processos alternativos de corte e imenda (Horne *et al.*, 2002) onde íntrons são removidos do transcrito primário e os éxons consecutivos são ligados, gerando diferentes isoformas pela inclusão dos éxons variantes (v1-v10) (Blaustein *et al.*, 2007).

**Fig. 2** Ilustração esquemática da estrutura protéica do CD44 evidenciando o domínio extracelular com o sítio de ligação para o AH, uma região proximal à membrana plasmática, variável pela presença dos éxons variantes, o domínio transmembrana e a cauda citoplasmática. Adaptado de Ponta *et al.*, 1998.



A isoforma padrão (CD44s) é a mais abundante nas células normais e consiste de um domínio extracelular, possuindo uma seqüência sinal N-terminal (éxon 1) e um sítio para a ligação ao AH (éxons 2 e 3), uma região proximal à membrana plasmática (éxons 4, 5, 16 e 17), um domínio transmembrana (éxon 18) e um domínio citoplasmático (éxon 20) (Thorne *et al.*, 2004).



**Fig. 3** Transcrito primário e RNAs mensageiros maduros do receptor CD44. O transcrito primário do CD44 contém seqüências codificadas por 20 éxons (1-10 e v1-v10). A maior e mais conhecida isoforma é a isoforma padrão (CD44s) que é amplamente expressa em vários tecidos de vertebrados em desenvolvimento e em organismos adultos. As isoformas variantes (CD44v5 a CD44v1-10) são expressas em tecidos epiteliais e células neoplásicas. Adaptado de Ponta *et al.*, 2003.

As múltiplas isoformas variantes existentes (CD44v1-CD44v10) resultam de splicing alternativo do transcrito primário envolvendo as regiões correspondentes aos 10 éxons restantes (Borland *et al.*, 1998). Ao contrário da isoforma padrão, as isoformas variantes são mais expressas comumente em células malignas (Fig. 3) (Afify *et al.*, 2005).

Todas as isoformas do CD44 compartilham uma grande identidade de aminoácidos (AA) entre diferentes espécies (Isacke & Yarwood, 2002). As regiões que possuem maior identidade são as de ligação com o AH, além dos domínios transmembrana e citoplasmático. O alinhamento das seqüências de AA mostrou que o domínio transmembrana é essencialmente invariante e o domínio citoplasmático é também altamente conservado, o que os tornam essenciais para a função do CD44 (Thorne *et al.*, 2004).

### **1.2.3. Ligantes**

Vários ligantes do CD44 têm sido identificados. Entre eles a osteoponina, sulfato de condroitina e outros componentes da matriz extracelular, como o colágeno e fibronectina, além de fatores de crescimento (Borland *et al.*, 1998). Porém, o CD44 é o principal receptor de superfície celular para o AH (Bajorath, 2000).

As interações celulares mediadas pelo CD44 estão geralmente relacionadas à afinidade pelo AH (Miyake *et al.*, 2006). O ácido hialurônico, também chamado hialuronan ou hialuronato, é um glicosaminoglicano (GAG) formado por seqüências lineares dissacarídicas de ácido glicurônico e N-acetilglicosamina. É o principal componente da matriz extracelular, contribuindo para a manutenção das características estruturais durante a formação e remodelamento dos tecidos (Toole, 2001). O AH possui pelo menos três sítios de ligação na molécula de CD44 e todas as isoformas do CD44 contém sítios de reconhecimento para o ácido hialurônico, mas nem todas as células expressam o CD44 ligado ao ácido hialurônico constitutivamente (Goodison *et al.*, 1999).

A osteoponina é uma citocina secretada por vários tipos celulares que induz a quimiotaxia celular. A ligação da osteoponina e expressão do CD44 podem causar a migração e metástase de células tumorais em sítios específicos (Borland *et al.*, 1998). Já o sulfato de condroitina é secretado pelas células hematopoiéticas e interage com o CD44 na agregação, aderência e ativação de células linfóides (Goodison *et al.*, 1999).

#### 1.2.4. Funções

A diversidade de isoformas do CD44 torna estas células potencialmente dotadas de várias funções operantes nos diversos eventos fisiológicos ou patológicos, na vida adulta ou embrionária, em células normais e malignas, no sistema imune ou em outros tecidos.

A interação CD44-AH é responsável pela mediação da maioria das funções do CD44. O principal papel fisiológico desta molécula é a manutenção dos órgãos e estrutura dos tecidos via adesão célula-célula e célula-matriz extracelular (Toyokawa *et al.*, 2005).

Nas células hematopoiéticas este receptor está envolvido na migração basal de linfócitos e monócitos, transmissão de sinais de crescimento, agregação, ativação e proliferação celular e indução da hematopoiese (Ohta *et al.*, 1999). Além disso, o CD44 participa da ligação, ingestão e remoção de células apoptóticas (Vachon *et al.*, 2006).

Alterações no padrão de expressão das moléculas de adesão em um tecido podem contribuir para uma desorganização funcional, característica das neoplasias (Lokeshwar *et al.*, 1996). Várias isoformas do CD44 têm sido correlacionadas com a tumorigenicidade e comportamento metastático em processos neoplásicos (Kaya *et al.*, 2001).

O CD44 pode estar ainda relacionado aos processos de cicatrização celular, angiogênese, migração e função das células de Langerhans e células dendríticas (Goodison *et al.*, 1999), além de ser um marcador em potencial de malignidade e metástase (Isacke & Yarwood, 2002).

O papel do CD44 na fisiologia reprodutiva tem sido bastante explorado. O CD44, além de estar presente no trato reprodutivo feminino, exerce importante influência na função dos gametas durante a migração celular, maturação e desenvolvimento embrionário (Tienthai *et al.*, 2003). Durante a embriogênese, os embriões precoces contêm uma quantidade elevada de AH, formando grandes espaços intercelulares que promovem o remodelamento da matriz extracelular e previnem o empacotamento celular e sobreposição das células (Borland *et al.*, 1998).

A expressão do CD44 tem sido verificada no epitélio luminal uterino de coelhas durante a fase de pré-implantação (Hohn *et al.*, 1995), no epitélio endometrial e placenta



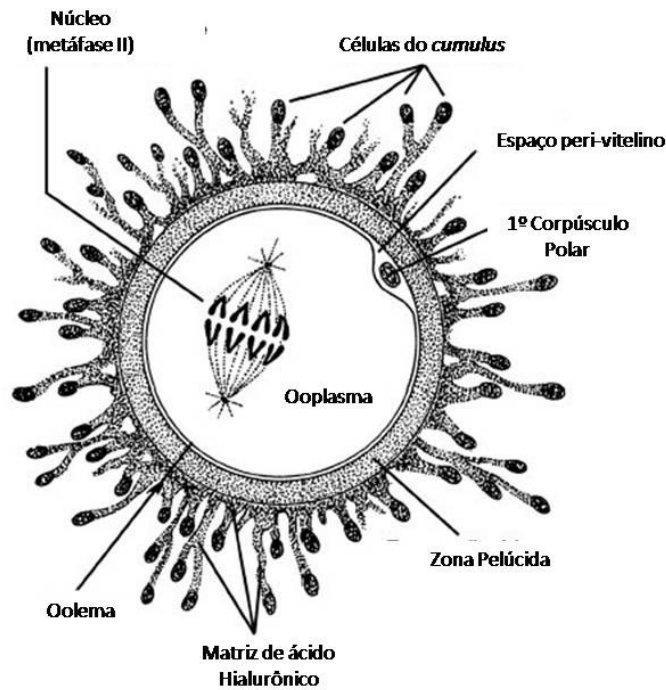
humana (Albers *et al.*, 1995 e Choi *et al.*, 2006) e no epitélio ovidutário em bovinos (Bergqvist *et al.*, 2006) e caprinos (Kimura *et al.*, 1995).

Segundo Yokoo *et al.*, (2007), a interação CD44-AH pode ser um importante requisito para a expansão do *cumulus* e/ou maturação do oócito. Vários estudos indicam que o CD44 pode influenciar a fertilidade e qualidade dos oócitos em suínos (Kimura *et al.*, 2002). Foi observada ainda a presença do CD44 em oócitos maturados e embriões pré-implantação em humanos (Campbell *et al.*, 1995) e bovinos (Furnus *et al.*, 2003 e Schoenfelder & Einspanier, 2003).

A maioria dos estudos acerca da expressão do CD44 em diferentes espécies verificou a presença do receptor em programas de produção *in vitro* de embriões. Porém, estudos como o de Yokoo *et al.* (2007), verificaram diferenças de comportamento do CD44 entre CCOs maturados *in vitro* e *in vivo*. Portanto, avaliar a expressão do receptor em oócitos e embriões oriundos da produção *in vivo* pode ser a melhor escolha para avaliar a fisiologia da expressão do CD44.

### **1.3. Maturação oocitária**

A maturação oocitária representa uma etapa de grande importância para o processo de fecundação e desenvolvimento embrionário. Esse processo envolve uma série de mudanças nucleares e citoplasmáticas, que preparam o oócito para a fecundação durante a retomada da meiose (Eppig, 2001). *In vivo*, esse processo tem início com o pico pré-ovulatório de LH durante o estro e, *in vitro*, com a simples retirada do oócito do folículo (Gonçalves *et al.*, 2008). *Entre* os principais eventos de transformações nucleares estão o rompimento do envelope nuclear, a condensação da cromatina e a formação do fuso mitótico (Fig. 4) (Sirard *et al.*, 1989). As mudanças citoplasmáticas mais comuns são a redistribuição, o aumento e as alterações morfológicas das organelas, o alinhamento dos grânulos corticais e a formação de gotas lipídicas (Sirard, 2001). Até o desenvolvimento de embriões competentes, muitos fatores biológicos atuam em conjunto na preparação do oócito (Yang *et al.*, 1998).



**Fig. 4** Esquema da maturação oocitária: formação do fuso mitótico e o núcleo em MII, o surgimento do primeiro corpúsculo polar e da matriz extracelular rica em ácido hialurônico. Adaptado de Colombo, 2006.

### 1.3.1. Maturação nuclear

Quando os oócitos de mamíferos são removidos dos seus folículos, têm a habilidade espontânea para sofrer meiose (Sirard *et al.*, 2006). Durante a fase de crescimento, oócitos de mamíferos são mantidos no estágio de diplóteno da prófase da primeira divisão meiótica. A meiose não é retomada até a puberdade, quando começam a ocorrer estímulos para que sua progressão ocorra. A maturação meiótica tem início quando ocorre a fragmentação e rompimento da membrana nuclear do oócito com a quebra da vesícula germinativa (Lénárt & Ellenberg, 2003). Ao mesmo tempo ocorre a condensação dos cromossomos, a formação do fuso, a separação dos cromossomos homólogos com extrusão do primeiro corpúsculo polar e a progressão para a metáfase da segunda divisão meiótica (MII).

### 1.3.2. Maturação citoplasmática

A maturação citoplasmática é caracterizada pela reorganização de organelas em número, tamanho e disposição. Simultaneamente, ocorre o bloqueio da transcrição de genes necessários para a síntese protéica (Assey *et al.*, 1994). Ocorre também um aumento gradativo de gotas lipídicas no oócito, a redução no compartimento de Golgi, o alinhamento dos grânulos corticais que formam um bloqueio estrutural à poliespermia e o surgimento de

numerosos ribossomos adjacentes aos cromossomos (Kruip *et al.*, 1983; Assey *et al.*, 1994). Após este período de intensas modificações, o oócito é considerado maduro e está apto a fecundação e o posterior desenvolvimento como embrião.

### 1.3.3. Interação *cumulus*-oócito

O complexo *cumulus*-oócito (CCO), a unidade estrutural do folículo antral, inclui várias camadas de células do *cumulus* (Salustri *et al.*, 1992). Apesar das células do *cumulus* não serem essenciais para a maturação nuclear dos oócitos, a maturação citoplasmática é bastante comprometida na ausência desse tipo celular (Gonçalves *et al.*, 2008).

No ovário de diversas espécies, o oócito e as células do *cumulus* estabelecem um contato por meio de junções comunicantes chamadas junções GAP (Grazul-Bilska *et al.*, 1997). Essas comunicações célula-célula são formadas por moléculas protéicas, que permitem a passagem direta de íons inorgânicos e outras pequenas moléculas hidrossolúveis, que funcionam como nutrientes e componentes químicos reguladores da maturação oocitária (Alberts, 2004). A modulação das junções comunicantes são de grande importância para o sucesso da foliculogênese e oogênese (Carabatsos *et al.*, 2000).

A deposição gradual da zona pelúcida na superfície do oócito é responsável pelo estabelecimento de uma matriz extracelular permanente entre as células germinativas e somáticas. A comunicação oócito-*cumulus* é facilitada por projeções transzonais das células do *cumulus* que atravessam a zona pelúcida e são ancoradas na superfície do oócito (Kidder & Mhawi, 2002).

Outra via de comunicação oócito-*cumulus* é através da sinalização parácrina. O oócito, como regulador da foliculogênese, produz alguns tipos de TGF- $\beta$  (Fator de crescimento transformante) como o GDF-9, que induz a secreção do ácido hialurônico pelas células do *cumulus* (Hurk & Zhao, 2005). Pouco antes da ovulação, seguido do surgimento de gonadotrofinas endógenas, um folículo aumenta rapidamente de volume pelo acúmulo de líquido folicular e pela pressão intra-folicular (Eppig, 1979). Concomitantemente, os CCOs formam uma matriz extracelular muco-elástica contendo uma grande quantidade de ácido hialurônico e suas proteínas específicas de ligação (Salustri *et al.*, 1992).

A degradação da matriz peri-folicular e a mucificação ou expansão do *cumulus* resultante da deposição da matriz extracelular, promovem a protusão e liberação do complexo *cumulus*-oócito com o advento da ovulação (Chen *et al.*, 1993).

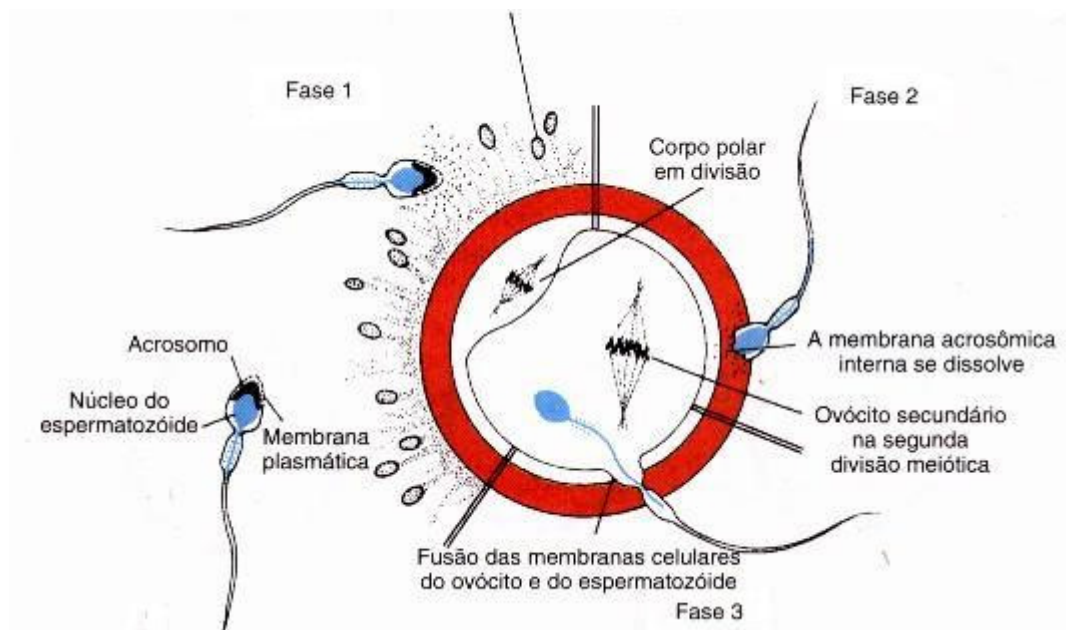
#### **1.4. Fecundação**

Na maioria dos mamíferos quando ocorre a ovulação, o oócito já em metáfase II da segunda divisão meiótica, depois de sofrer mudanças nucleares e citoplasmáticas, prepara-se para o evento de fecundação com a sua completa maturação.

Assim como o gameta feminino, os espermatozóides sofrem profundas modificações durante sua maturação, até adquirir capacidade de fecundação após os eventos de capacitação espermática e reação acrossômica, onde os componentes da superfície do espermatozóide são modificados ou removidos através de secreções encontradas no trato reprodutivo da fêmea (Garner & Hafez, 2004).

Existem vários estudos tratando dos fenômenos envolvidos na fecundação em mamíferos domésticos. Entre os eventos cruciais para o sucesso da fecundação e desenvolvimento embrionário estão a migração espermática entre as células do *cumulus*, a fixação espermática através da zona pelúcida e a fusão entre a membrana plasmática do oócito e o espermatozóide (Fig. 5) (Yanagimachi, 1981).

A penetração do oócito para ocorrência da fecundação necessita do recrutamento de vários espermatozóides móveis com a finalidade de atravessar a zona pelúcida, o que ocorre somente após reação acrossômica, com a fusão da membrana plasmática do espermatozóide e a membrana externa do acrossomo, liberando enzimas hidrolíticas (Yanagimachi & Usui, 1974).



**Fig. 5.** Esquema dos principais eventos da fecundação. Fase 1 - migração espermática entre as células do cumulus; Fase 2 – dissolução da membrana acrosômica e fixação espermática através da zona pelúcida; Fase 3 - fusão entre a membrana plasmática do oócito e o espermatozóide. Adaptado de Sadler, 1999.

Quando o espermatozóide consegue penetrar a membrana vitelina, a célula-ovo ativada ou zigoto completa a meiose e ocorre a extrusão do primeiro e/ou segundo corpúsculo polar para dentro do espaço vitelino. Após esse estágio, os embriões sofrem várias divisões mitóticas, contando com o ambiente materno para seu suporte metabólico, conseguido através das secreções ovidutárias e uterinas (Gonçalves *et al.*, 2008).

### 1.5. Desenvolvimento embrionário inicial

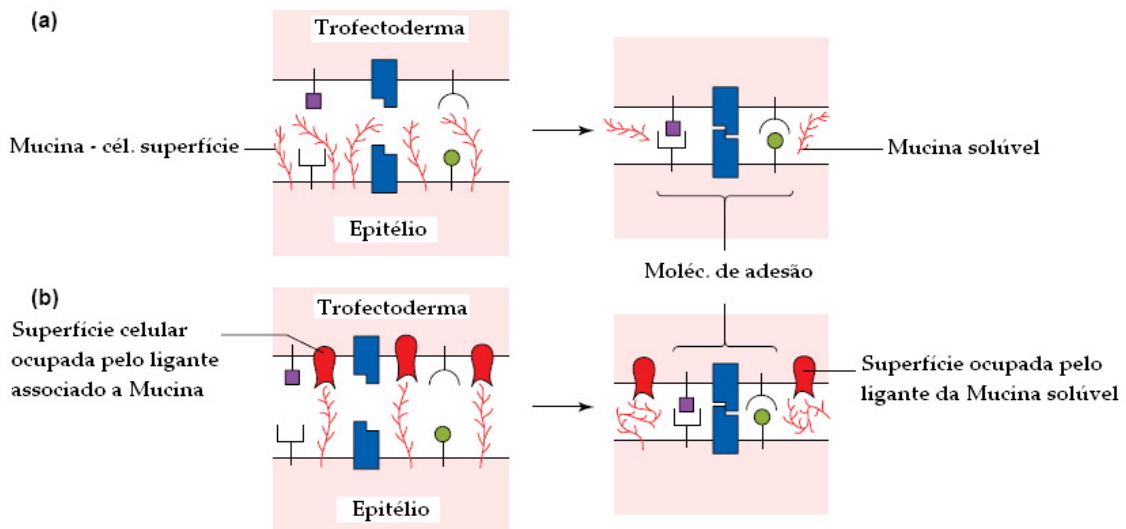
Os embriões prosseguem seu desenvolvimento da primeira divisão de clivagem até o estágio de blastocisto, quando ocorre uma transcrição ativa e acúmulo de novo RNAm do genoma do zigoto com a ativação do genoma embrionário que na espécie ovina ocorre no estágio entre oito e 16 células (Hafez & Hafez, 2004).

Outros eventos cruciais para o sucesso do desenvolvimento embrionário e ainda pouco elucidados são os mecanismos envolvidos no processo de implantação embrionária (Bowen & Burghardt, 2000).

Após um período inicial de clivagem e formação do blastocisto, os embriões mamíferos fazem o contato com uma fonte externa de nutrientes no ambiente uterino objetivando o sucesso no seu desenvolvimento. A conseguinte expansão do blastocisto resulta

no rompimento da zona pelúcida (Seshagiri *et al.*, 2002), sendo este evento pré-implantação limitante e crítico para o sucesso da gestação.

Um dos fatores que podem estar envolvidos com a regulação do momento de implantação é a presença de uma glicoproteína transmembrana, denominada MUC-1, abundante na superfície apical do epitélio uterino na fase não-receptiva da gestação (Fig.6). (Aplin, 1997).



**Fig. 6.** (a) Mucinas de superfície do epitélio endometrial, tal como MUC-1 na inibição da interação do embrião-endométrio. A redução local na densidade da MUC-1 na superfície celular permite o acesso de receptores de expressão no trofoblasto. (b) Bloqueio inicial do trofoblasto aos glicanos pela mucina endometrial, seguido por interações adicionais mediadas por outros sistemas de adesão. Adaptado de Aplin, 1997.

Interações bioquímicas entre o embrião e o sistema imune são importantes no estabelecimento da gestação. O sistema imunológico materno é altamente complexo e rigorosamente regulado para obter uma efetiva e apropriada resposta para o desenvolvimento do embrião. Em ruminantes, a alta incidência de perdas embrionárias, que podem resultar de uma interação bioquímica-celular insuficiente, ocorre no início da prenhez (Roberts *et al.*, 1990; Peters, 1996). Assim, as perdas podem também ser resultados de um leque de mudanças inadequadas no ambiente imunológico, como tipos e números de células imunes próximas aos sítios de implantação. Embora se tenha estabelecido os mecanismos exatos pelos quais o ambiente imunológico materno passa durante o período inicial da prenhez, estes não são completamente conhecidos, como as mudanças na distribuição de células

imunológicas (Perez-Martinez *et al.*, 2002) e a produção local de citocinas são envolvidas no estabelecimento do próprio microambiente uterino (Hansen, 1995; Hansen *et al.*, 1999).

## JUSTIFICATIVA

Vários fatores influenciam a produtividade de diferentes espécies domésticas. Entre estes fatores podem ser citadas a nutrição, a sanidade e a reprodução. No que se refere à reprodução, práticas adequadas de manejo, além da utilização de modernas técnicas reprodutivas podem contribuir para o aumento da produtividade. Para a espécie ovina, estes conceitos são também verdadeiros e estão sendo cada vez mais empregados, sobretudo em países com maior tradição na exploração desta espécie e em animais geneticamente privilegiados. No Brasil, esse potencial produtivo, na maioria das vezes, não é convenientemente explorado; devido, entre outros fatores, ao desconhecimento tecnológico e tradicionalismo dos métodos de exploração.

Dentre as estratégias para atender tais expectativas encontra-se a modernização tecnológica a fim de acelerar o ganho genético de animais superiores e de superar alguns obstáculos da eficiência reprodutiva.

Na biologia reprodutiva, o conhecimento dos mecanismos fisiológicos e eventos nos quais determinadas moléculas controlam a maturação do oócito e desenvolvimento embrionário podem gradativamente incrementar as técnicas reprodutivas possibilitando uma minimização das perdas embrionárias.

No caso do CD44, nenhuma informação existe na literatura sobre sua identificação em gametas ou embriões ovinos, sendo sua observação nesta espécie, um passo importante para o conhecimento de fenômenos fisiológicos ocorrendo durante o processo de maturação oocitária, fecundação e posterior desenvolvimento embrionário.



## **HIPÓTESE CIENTÍFICA**

O receptor CD44 está presente em oócitos imaturos e maturados e em embriões da espécie ovina.

## OBJETIVOS

### Geral

Investigar, através de imunofluorescência indireta, a presença do receptor CD44 na superfície de oócitos e embriões desta espécie.

### Específicos

- ✓ Confirmar a imunoreatividade cruzada de um anticorpo monoclonal anti-CD44 humano contra o receptor ovino;
- ✓ Verificar a presença do receptor CD44 ovino em oócitos imaturos;
- ✓ Observar a presença do receptor CD44 ovino em oócitos maturados *in vivo*;
- ✓ Avaliar a presença do CD44 ovino em embriões no estágio pré-implantacional produzidos *in vivo*.

# Capítulo 1

## **Detection of CD44 receptor, a cellular adhesion molecule, in sheep oocytes and embryos**

(Detecção do receptor CD44, uma molécula de adesão celular, em oócitos e embriões ovinos)

**Enviado para:** Reproduction in Domestic Animals

**Fator de Impacto:** 1,503

### **Resumo:**

A família do receptor CD44 pertence a um grande grupo de moléculas de adesão multifuncionais amplamente expressas em muitos tipos de células e envolvidas em atividades fisiológicas como interações célula-célula e célula-matriz extracelular. O objetivo deste estudo foi investigar, através de imunofluorescência indireta, a presença do receptor CD44 em oócitos e embriões ovinos. Para tanto, oócitos imaturos foram obtidos por punção folicular em ovários de ovelhas adultas deslanadas provenientes de abatedouro. Oócitos maturados e embriões foram obtidos também de ovelhas adultas deslanadas submetidas a tratamento hormonal para estimulação ovariana usando um protocolo hormonal padrão para a espécie. Uma laparotomia, seguida de lavagem ovidutária ou uterina, foi realizada para obtenção dos oócitos maturados ou embriões, respectivamente. A detecção do CD44 ovino foi realizada utilizando um anticorpo monoclonal murino anti-CD44 humano (clone DF1485) e anticorpo secundário conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Linfócitos humanos e oócitos bovinos imaturos foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. A confirmação do estágio nuclear dos oócitos, bem como a classificação do estágio de desenvolvimento embrionário, foram avaliadas utilizando a coloração com Hoechst 33342. Todas as estruturas foram avaliadas em microscópio de epifluorescência munido de sistema de registro de imagem. Oócitos imaturos não apresentaram marcação fluorescente para FITC, indicando a ausência do receptor CD44. Já em oócitos maturados e embriões, foi observada fluorescência com distribuição homogênea, com maior intensidade de sinal nos primeiros. Em conclusão, em ovinos, o receptor CD44 não é expresso em oócitos antes do processo de maturação e, adicionalmente, o nível de expressão em embriões no estágio pré-implantacional é menor do que aquele em oócitos maturados.

# **Detection of the CD44 receptor, a cell adhesion molecule, in sheep oocytes and embryos**

JV Luz, AS Alcântara-Neto, LM Melo, DIA Teixeira and VJF Freitas

*Universidade Estadual do Ceará, Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR), Fortaleza-CE, Brazil*

Running head: CD44 in sheep oocytes and embryos

\*Corresponding author:

Vicente José de Figueirêdo Freitas

Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução

Universidade Estadual do Ceará-Faculdade de Veterinária

Av. Dedé Brasil, 1700 – Fortaleza, CE, 60.740-093, Brazil

Tel.: +55 85 3101 9861

Fax: +55 85 3101 9840

E-mail address: [vjff@pq.cnpq.br](mailto:vjff@pq.cnpq.br) (V.J.F. Freitas)

## Contents

The CD44 receptor family belongs to a large group of multifunctional adhesion molecules widely expressed in many cell types and involved in physiological activities such as cell-cell and cell-extracellular matrix interactions. The aim of this study was to investigate using indirect immunofluorescence the presence of CD44 receptor in sheep oocytes and embryos. Therefore, immature oocytes were obtained by follicular puncture in ovaries of adult hair sheep from a slaughterhouse. Mature oocytes and embryos were also obtained from adult hair ewes submitted to hormonal treatment for ovarian stimulation using the standard hormonal protocol for this species. A laparotomy, followed by oviduct or uterine flushing, was performed to obtain mature oocytes or embryos, respectively. The detection of sheep CD44 was carried out utilizing a mouse anti-human CD44 monoclonal antibody (clone DF1485) and secondary antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC). Human lymphocytes and immature bovine oocytes were used as positive and negative controls, respectively. Confirmation of the nuclear stage of the oocytes, as well as the classification of the stage of embryonic development, was carried out with Hoechst 33342 staining. All structures were evaluated with an epifluorescence microscope equipped with an image recording system. Immature oocytes did not show fluorescent staining for FITC, indicating the absence of CD44 receptor. However, in mature oocytes and embryos, fluorescence was observed with homogeneous distribution, with greater signal intensity in the former. In conclusion, CD44 receptor in sheep is not expressed in oocytes before the maturation process, and in addition, the level of expression in embryos at the pre-implantation stage is lower than that in mature oocytes.

## Introduction

Cellular adhesion molecules (CAMs) are surface glycoproteins with strong affinity for specific ligands (Goodison et al. 1999). They perform an important role in defining cell shape and degree of contact with neighboring cells. In addition, CAMs contribute to the formation and maintenance of cellular junctions and constitute a wide network of cell-cell and cell-matrix extracellular interactions (Lu et al. 2002).

The transmembrane glycoprotein CD44 exists as multiple isoforms expressed in a specific manner for different cell types. These isoforms result from splicing and post-translational modifications, where they can be glycosylated differently (Kaya et al. 2001; Horne et al. 2002).

Since it is multistructural and multifunctional adhesion molecule, CD44 receptor is known for being involved in a variety of physiological and pathological processes (Isacke and Yarwood 2002). Within this versatility are processes of migration and cell adhesion, basal migration of lymphocytes and monocytes (Vachon et al. 2006) and even potential markers of malignancy and metastasis (Kaya et al. 2001; Borland et al. 1998; Franzmann et al. 2007). The multiple functions of CD44 are centered on its binding with hyaluronic acid, a type of glycosaminoglycan (GAG), a component of the extracellular matrix of many animal tissues (Goodison et al. 1999).

In reproductive biology, studies have indicated that CD44 can influence the quality and fertility of oocytes (Goodison et al. 1999; Schoenfelder and Einspanier 2003), as well as embryonic development (Goodison et al. 1999, Kimura et al. 2007). Additionally, its expression on cells of the *cumulus* coincides with the expansion of these cells during the maturation of the oocyte (Yokoo et al. 2002).

Various studies have investigated CD44 receptor in *cumulus*-oocyte complexes (COCs) and in embryos of diverse species. This glycoprotein has already been identified in swine COCs

(Yokoo et al. 2007) and bovine mature oocytes and embryos (Furnus et al. 2003), besides human embryos (Campbell et al. 1995). However, no study has been conducted to date in the ovine species. Therefore, the aim of the present work was to determine the presence of CD44 receptor on the surface of oocytes and in embryos of this species, using indirect immunofluorescence.

## **Material and Methods**

### **Recovering immature oocytes**

The ovaries of six adult hair ewes from the local slaughterhouse were transported to the laboratory at 37°C in saline (0.9% NaCl) containing antibiotics, in no more than 3 h after slaughter. Ovarian follicles with a diameter of 2 to 5 mm were punctured and aspirated with a vacuum line (30-50 mmHg) using a 19G 1 ¼ in. needle coupled to a sterile tube containing 4 ml of phosphate-buffered saline (PBS). The COCs collected were washed eight times in drops of PBS and evaluated with a stereomicroscope (Nikon SMZ-800, Kawasaki, Japan) at 10 to 50× magnification. The COCs of grade I or II, according to the classification of Gibbons et al. (2007), were stripped mechanically by successive pipetting. The oocytes obtained were utilized in indirect immunofluorescence assays.

### **Production of mature oocytes *in vivo***

Three hair ewes, aged between 1 and 5 years, were utilized as mature oocyte donors. They were submitted to hormonal treatment for estrus synchronization and superovulation. This was carried out with the use of intravaginal sponges impregnated with 60 mg of medroxyprogesterone acetate (Progespon, Sintex, Buenos Aires, Argentina) for 14 days, and at 48 h before removing the sponge, the females were given a total of 150 mg of pFSH

(Folltropin-V, Vetrepharm, Ontario, Canada) divided into decreasing doses for 3 days, with 12-h intervals (30/30, 25/25 and 20/20 mg). Estrus was detected at 24 h after removal of the sponge using a teaser. The mature oocytes were recovered at 96 h after removal of the sponge by laparotomy followed by oviductal flushing. The oviduct was flushed retrogradely with 15-20 ml of DMPBS (Nutricell, São Paulo, Brazil) and the structures recovered were evaluated with a stereomicroscope at 10 to 50× magnification for later use for indirect immunofluorescence.

### **Production of embryos *in vivo***

Six hair ewes, aged between 1 and 5 years, were submitted to the same hormonal treatment as describe previously. Additionally, the females were mated at the beginning of estrus and 24 h afterward, utilizing rams of proven fertility. The embryo recovery was performed by laparotomy six days after the first mating. Shortly after the exposure of the genital tract, each uterine horn was flushed retrogradely with 20-40 ml of DMPBS. The evaluation of the quality and stage of development of the embryos was performed with a stereomicroscope at 10 to 50× magnification for later indirect immunofluorescence.

### **Indirect immunofluorescence**

Immature and mature oocytes and embryos were washed eight times in drops of PBS and deposited on slide coated with poly-L-lysine (Polysciences Inc., Eppelheim, Germany). The structures were fixed in 4% paraformaldehyde (pH 7.4) in PBS, at 25°C for 20 min, permeabilized with 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) and then washed three times in PBS. The specimens were then incubated for 3 h at 25°C with anti-human CD44 monoclonal antibody, DF1485 (Visionbiosystems Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), diluted to 1:40 in PBS containing 3% BSA. After three washings in PBS, the



specimens were incubated in the dark for 1 h with anti-mouse IgG antibody conjugated with FITC (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) diluted 1:100 in PBS containing 3% BSA. After three washings with PBS, the specimens were stained with Hoechst 33342 (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) at 1 $\mu$ g/ml for 15 min, for determination of the stage of development of the structures. Finally, the slides were mounted with 90% glycerol in PBS and examined with a Nikon Eclipse E400 microscope (Tokyo, Japan) with epifluorescence illumination, using a B-2A filter for fluorescein (excitation wavelength: 450-490 nm) and UV-2A filter for Hoechst 33342 (excitation wavelength: 330-380 nm). The images were recorded utilizing the Nikon DS-5M-L1 system (Tokyo, Japan) coupled to the microscope.

### **Experimental controls**

Human lymphocytes (Wagner et al. 1998) and immature bovine oocytes (Furnus et al. 2003) were used as positive and negative controls, respectively, for the presence of CD44 receptor. Additionally, to exclude the possibility of false-positive fluorescence due to non specific binding with the secondary antibody or because of autofluorescence induced by paraformaldehyde, slides were prepared with lymphocytes, oocytes and embryos ( $n \geq 5$ ) which were treated in the same manner as described above but omitting the primary antibody or primary and secondary antibodies, respectively. The immature bovine oocytes were obtained using a method similar to that described for the ovine oocytes. Human lymphocytes were isolated from heparinized peripheral blood by separation in a Ficoll-Paque PLUS density gradient according to the manufacturer's instructions (GE Health Care - BioSciences, Uppsala, Sweden).

## Results

A total of 30 COCs of grade I and II were recovered from ovaries obtained from a slaughterhouse, providing a mean recovery of 2.5 COCs/ovary. With respect to the production of mature oocytes *in vivo*, from a total of 36 ovulations, 25 structures were recovered, corresponding to a recovery rate of 69.4%. The embryo donors had a total 95 ovulations, which at a recovery rate of 45.3%, resulted in 43 embryos recovered.

Fig. 1 presents representative images of the control and experimental groups.

Fig. 1.

Fluorescent staining with Hoechst 33342 allowed the visualization of the germinal vesicle in immature oocytes (Fig. 1 B.2 and C.2), metaphase plate and/or polar corpuscle in mature oocytes (Fig. 1 D.2) as well as the approximate number of nuclei in at the pre-implantation embryos (Fig.1 E.2). In addition, this nuclear staining confirmed the majority of lymphocytes isolated from human peripheral blood (Fig. 1 A.2). Together, the images of the embryos in bright field (Fig. 1 E.1) and after staining with Hoechst 33342 (Fig. 1 E.2) showed their classification as the compact morula stage.

A homogeneous staining with FITC was observed in mature oocytes (Fig. 1 D.3) and embryos (Fig. 1 E.3), where the fluorescent signal was the most intense in the first group. After removal of the baseline signal from autofluorescence, there was no FITC staining of immature oocytes of ewes (Fig. 1 C.3) and cows (Fig. 1 B.3). However, human lymphocytes showed an intense fluorescent staining, distributed mainly in the peripheral region (Fig. 1 A.3). No structure showed a FITC fluorescence signal as result of non specific binding of secondary antibody (data not shown).

## Discussion

In reproductive biology, the expression of various adhesion molecules can contribute to the modulation of the development of oocytes and embryos (Lu et al. 2002; Talbot et al. 2003). Along this line, CD44 has been shown to have an influence on the expansion of the *cumulus* during the maturation of the oocyte (Yokoo et al. 2002), on fertility and quality of oocytes (Goodison et al. 1999; Schoenfelder and Einspanier 2003), and on embryonic development as well (Goodison et al. 1999, Kimura et al. 2007). The various investigations on CD44 receptor have involved their detection in different animal species as well as their action in various steps in the reproductive process (Campbell et al. 1995; Valcarcel et al. 1999; Kim et al. 2005).

In the present study, we detected the sheep CD44 receptor utilizing an anti-human CD44 antibody (clone DF1485). The identification of CD44 receptor in different animal species, in general, can be carried out successfully because of cross-reaction with an antibody raised against the human receptor (Yang and Binns 1993; Valcarcel et al. 1999; Kimura et al. 2007). The binding of DF1485 monoclonal antibody to sheep CD44 was detected indirectly using epifluorescence microscopy in *in vivo* mature oocytes and in embryos in the compact morula stage, thereby indicating the presence of the receptor in these cells. On the other hand, sheep immature oocytes which do not express CD44 receptor did not show FITC fluorescence signals. Similar results have been described in other animal species, where investigations on the expression of CD44 in swine COCs during the process of oocyte maturation *in vitro*, indicate that this receptor is not present in immature oocytes (Yokoo et al. 2007).

Additionally, this molecule is expressed only in *cumulus* cells of these structures (Kimura et al. 2002). Furnus et al. (2003) utilized indirect immunofluorescence to detect CD44 receptor on bovine oocytes and embryos. The authors found that this receptor is present in mature oocytes and embryos in different pre-implantation stages, while undetectable in immature

oocytes. Campbell et al. (1995) demonstrated by indirect immunofluorescence that CD44 is present on the surface of human oocytes and *cumulus* cells continuing to be expressed on the embryonic surface at the pre-implantation stage.

In addition, the present work showed qualitatively that fluorescence intensity was higher in mature oocytes *in vivo* than that in sheep embryos. A semi-quantitative analysis of CD44 in mature oocytes *in vivo* and embryos in mice, performed using indirect immunofluorescence and photometry, showed dynamic changes in the expression of this receptor. The latter study reported decreasing levels of expression from the oocyte up to the embryo in the morula stage (Lu et al. 2002). The elevated level of expression of CD44 in mature oocytes, *in vitro* or *in vivo*, suggests their involvement in the maintenance of COCs. Which isoforms of CD44 are expressed and if they are differentially modulated in different stages of development remain to be determined, since the specific antibodies for this purpose are not available.

The results of this study indicate that CD44 is expressed on the surface of both mature oocytes and in embryos in the pre-implantation stage. The findings of this study can be useful in the definition, the investigation and eventually the understanding of the physiological role of this adhesion molecule, CD44, in the reproductive processes involved in the ovine species.

## **Acknowledgements**

The authors would like to thank to the staff of LFCR for animal care. This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, Brazil). JV Luz is a recipient of a grant CNPq and VJF Freitas is a senior research of CNPq.

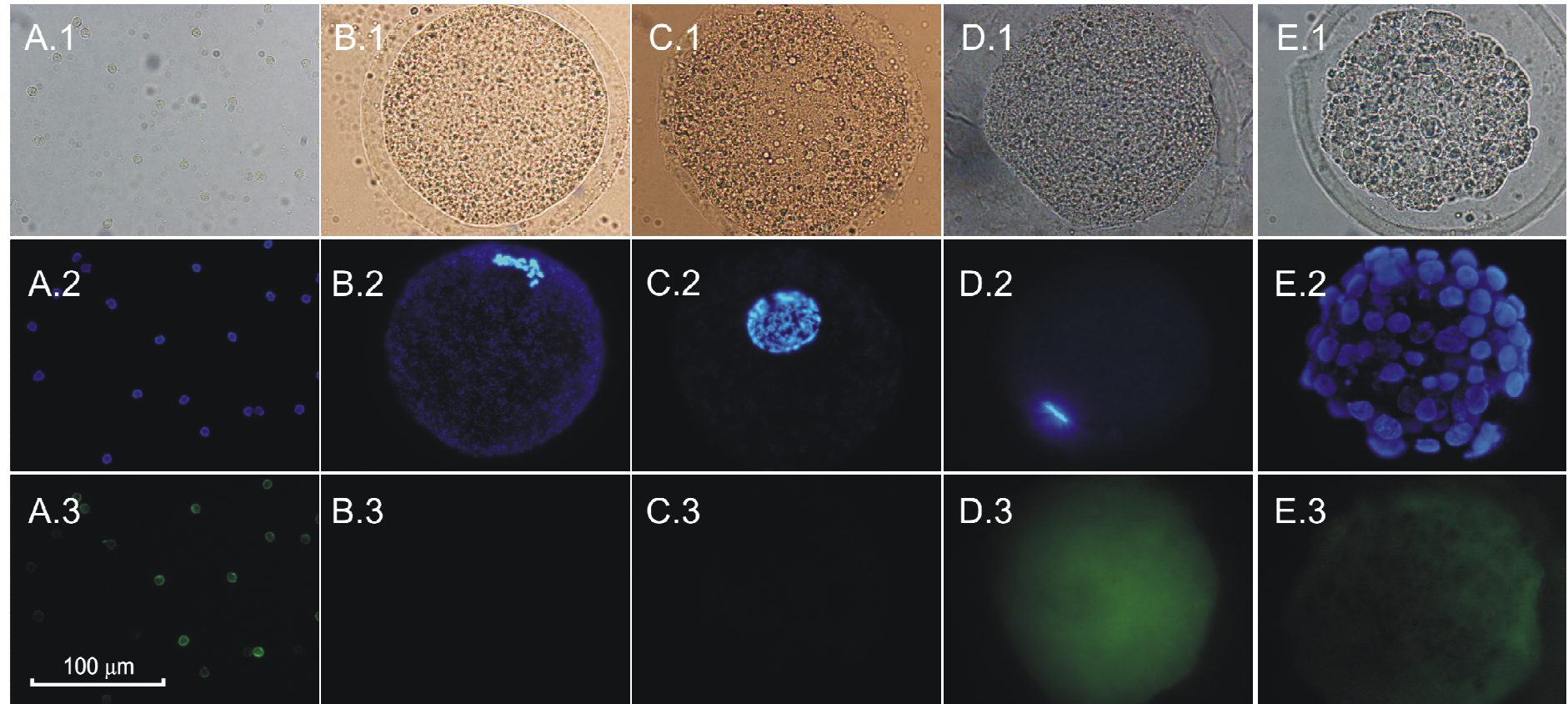
## References

- Borland G, Ross JA, Guy K, 1998: Forms and functions of CD44. *Immunology* **93**, 139–148.
- Campbell S, Swam HR, Aplin JD, Seif MW, Kimber SJ, Elstein M, 1995: CD44 is expressed throughout preimplantation human embryo development. *Hum Reprod* **10**, 425–430.
- Franzmann EJ, Reategui EP, Pedroso F, Pernas FG, Karakullukcu BM, Carraway KL, Hamilton K, Singal R, Goodwin WJ, 2007: Soluble CD44 is a potential marker for the early detection of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**, 1348–1355.
- Furnus CC, Valcarcel A, Dulout FN, Errecalde AL, 2003: The hyaluronic acid receptor (CD44) is expressed in bovine oocytes and early stage embryos. *Theriogenology* **60**, 1633–1644.
- Gibbons A, Pereyra Bonnet F, Cueto MI, Catala M, Salamone DF, Gonzalez-Bulnes A, 2007: Procedure for maximizing oocyte harvest for in vitro embryo production in small ruminants. *Reprod Domest Anim* **42**, 423–426.
- Goodison S, Urquidi V, Tarin D, 1999: CD44 cell adhesion molecules. *J Clin Pathol* **52**, 189–196.
- Horne AW, White JO, Lalani E-N, 2002: Adhesion molecules and the normal endometrium. *BJOG* **109**, 610–617.
- Isacke CM, Yarwood H, 2002: The hyaluronan receptor, CD44. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 718-721.

- Kaya G, Laurini R, Chaubert P, Gross N, 2001: Expression of CD44 and its isoforms in the fetal neuroblasts. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **9**, 180–184.
- Kim HS, Lee GS, Hyun SH, Nam DH, Lee SH, Jeong YW, Kim S, Kim JH, Kang SK, Lee BC, Hwang, WS, 2005: Embryotropic effect of glycosaminoglycans and receptors in development of porcine pre-implantation embryos. *Theriogenology* **63**, 1167–1180.
- Kimura N, Hoshino Y, Totsukawa K, Sato E, 2007: Cellular and molecular events during oocyte maturation in mammals: molecules of cumulus-oocyte complex matrix and signalling pathways regulating meiotic progression. *Soc Reprod Fertil Suppl* **63**, 327–342.
- Kimura N, Konno Y, Miyoshi K, Matsumoto H, Sato E, 2002: Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol Reprod* **66**, 707–717.
- Lu DP, Tian L, O'Neill CO, King NJC, 2002: Regulation of cellular adhesion molecule expression in murine oocytes, peri-implantation and post-implantation embryos. *Cell Res* **12**, 373–383.
- Schoenfelder M, Einspanier R, 2003: Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. *Biol Reprod* **69**, 269–277.
- Talbot P, Shur BD, Myles DG, 2003: Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol Reprod* **68**, 1–9.

- Vachon E, Martin R, Plumb J, Kwok V, Vandivier RW, Glogauer M, Kapus A, Wang X, Chow CW, Grinstein S, Downey GP, 2006: CD44 is a phagocytic receptor. *Blood* **107**, 4149-4158.
- Valcarcel A, de Matos DG, Furnus CC, 1999: The hyaluronic acid receptor (CD44) is expressed in bovine oocytes and pre-implantational stage embryos. *Theriogenology* **51**, 193.
- Wagner SN, Wagner C, Reinhold U, Funk R, Zoller M, Goos M, 1998: Predominant expression of CD44 splice variant v10 in malignant and reactive human skin lymphocytes. *J Invest Dermatol* **111**, 464–471.
- Yang, RH, Binns, M: Isolation and characterization of the soluble and membrane-bound porcine CD44 molecules, 1993. *Immunology* **78**, 547–554.
- Yokoo M, Miyahayashi Y, Naganuma T, Kimura N, Sasada H, Sato E, 2002: Identification of hyaluronic acid-binding proteins and their expressions in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol Reprod* **67**, 1165–1171.
- Yokoo M, Shimizu T, Kimura N, Tunjung WAS, Matsumoto H, Abe H, Sasada H, Rodriguez-Marinez H, Sato E, 2007: Role of the Hyaluronan receptor CD44 during porcine oocyte maturation. *J Reprod Dev* **53**, 263–270.
- Yokoo M, Tientha P, Kimura N, Niwa K, Sato E, Rodriguez-Marinez H, 2002: Localisation of the hyaluronan receptor CD44 in porcine cumulus cells during in vivo and in vitro maturation. *Zygote* **10**, 317–326.

## Figure captions



**Fig. 1.** Detection of CD44 receptor by indirect immunofluorescence staining (FITC) in sheep oocytes and embryos. Columns show human lymphocytes (positive control, A.1-3), immature bovine oocyte (negative control, B.1-3), immature (C.1-3) and mature (D.1-3) sheep oocytes and sheep compact morula (E.1-3). Photographs of representative structures in bright field (A.1-E.1) and epifluorescence for Hoechst 33342 (A.2-E.2) and FITC (A.3-E.3).



## CONCLUSÕES

O anticorpo anti-CD44 humano, clone DF1485, reage cruzadamente com o receptor CD44 ovino, e apresentou-se eficiente para detecção do mesmo quando do uso de imunofluorescência indireta.

Em ovinos, o receptor CD44 não é expresso em oócitos antes do processo de maturação.

O nível de expressão do receptor CD44, em ovinos, é menor em embriões no estágio pré-implantacional do que em oócitos maturados *in vivo*.

## **PERSPECTIVAS**

As moléculas de adesão são estruturas fundamentais nas mais variadas etapas do desenvolvimento celular. Neste contexto, a partir do conhecimento de que oócitos e embriões ovinos possuem este receptor, os mecanismos fisiológicos e eventos nos quais determinadas moléculas controlam a maturação e desenvolvimento embrionário podem ser melhor compreendidos.

A realização de estudos posteriores tais como a quantificação do nível de expressão, pode ser uma ferramenta útil para o aperfeiçoamento gradativo das técnicas reprodutivas, aumentando sua eficiência e possibilitando a minimização das perdas embrionárias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., PILLAI, S. Receptores de Antígenos e Moléculas Acessórias dos Linfócitos T. In: *Imunologia celular e molecular*. 5.ed. Rio de Janeiro: **Saunders Elsevier**. cap.6: p. 109-130, 2005.
- AFIFY, A.M., CRAIG, S., PAULINO, A.F.G., STERN, R. Expression of hyaluronic acid and its receptors, CD44s and CD44v6, in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium. **Ann. Diagn. Pathol.** v.12, p. 231-232, 2005.
- ALBERS, A., THIE, M., HOHN, H.P., DENKER, H.W. Differential expression and localization of integrins and CD44 in the membrane domains of human uterine epithelial cells during the menstrual cycle. **Acta Anat.** v.153, p.12-19. 1995.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTSON, J.D. Junções celulares, adesão celular e a matriz extracelular. In: *Biologia molecular da célula* 4.ed. Porto Alegre: **Artmed**. cap. 19. p: 949-1001, 2004.
- APLIN, J.D. Adhesion molecules in implantation. **Rev. Reprod.** v. 2, p. 84-93, 1997.
- ARUFFO, A., STAMENKOVIC, I., MELNICK, M., UNDERHILL, C.B., SEED, B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. **Cell.** v. 61, p. 1303-1313, 1990.
- ASSEY, R.J., HYTTEL, P., GREVE, T., PURWANTARA, B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. **Mol. Reprod. Dev.** v. 37, p. 335-344, 1994.
- BAJORATH, J. Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions. **Proteins.** v. 39, 103-111, 2000.
- BERGQVIST, A.S., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sulphated glycosaminoglycans (S-GAGs) and syndecans in the bovine oviduct. **Anim. Reprod. Sci.** v. 93, p. 46-60, 2006.
- BEVILAQUA, M.P., NELSON, R.M. Selectins. **J. Clin. Invest.** v. 91, p. 379-387, 1993.
- BLAUSTEIN, M., PELISCH, F., SREBROW, A. Signals, pathways and splicing regulation. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 39, p. 2031-2048, 2007.

- BORLAND, G., ROSS, J.A., GUY, K. Forms and functions of CD44. **Immunology**. v. 93, p. 139–148, 1998.
- BOWEN, J.A., BURGHARDT, R.C. Cellular mechanisms of implantation in domestic farm animals. **Semin. Cell. Dev. Biol.** v. 11, p. 93–104, 2000.
- CAMPBELL, S., SWAM, H.R., APLIN, J.D., SEIF, M.W., KIMBER, S.J., ELSTEIN, M. CD44 is expressed throughout preimplantation human embryo development. **Hum. Reprod.** v. 10, p. 425–430, 1995.
- CARABATSOS, M.J., SELBITTO, C., GOODENOUGH, D.A., ALBERTINI, D.F. Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. **Dev. Biol.** v. 226, p. 167-179, 2000.
- CHEN, L., ZANG, H., POWERS, R.W., RUSSEL, P.T., LARSEN, W.J. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles of the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. **Mol. Reprod. Dev.** v. 34, p. 87-93, 1993.
- CHOI, C.H., ROH, C.R., KIM, T.J., CHOI, Y.L., LEE, J.W., KIM, B.G., LEE, J.H., BAE, D.S. Expression of CD44 adhesion molecules on human placentae. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.** v.128, p. 243-247, 2006.
- CICHY, J., PURÉ, E. The liberation of CD44. **J. Cell Biol.** v. 161, p. 839-843.
- COLOMBO, R. The human embryo before implantation. **Pontificia Acad. Pro Vita**. Disponível em: <<http://www.academiavita.org>. Acesso em 06 julho. 2002.
- ELANGBAM, C.S., QUALLS, C.W., DAHLGREN, R.R. Cell Adhesion Molecules – Update. **Vet. Pathol.** v. 34, p. 61-73, 1997.
- EPPIG, J.J. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte *cumulus*-cell complexes from mouse preovulatory follicles. **Nature**. v. 281, p. 483-484, 1979.
- EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**. v. 122, p. 829-838, 2001.

FRANZMANN, E.J., REATEGUI, E.P., PEDROSO, F., KARAKULLUKCU, B.M., CARRAWAY, K.L., HAMILTON, K., SINGAL, R., GOODWIN, W.J. Soluble CD44 is a potential marker for the early detection of head and neck cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** v. 16, p. 1348–1355, 2007.

FURNUS, C.C., VALCARCEL, A., DULOUT, F.N., ERRECALDE, A.L. The hyaluronic acid receptor (CD44) is expressed in bovine oocytes and early stage embryos. **Theriogenology.** v. 60, p. 1633–1644, 2003.

GIBBONS, A., PEREYRA BONNET, F., CUETO, M.I., CATALA, M., SALAMONE, D.F., GONZALEZ-BULNES, A. Procedure for maximizing oocyte harvest for in vitro embryo production in small ruminants. **Reprod. Domest. Anim.** v. 42, p. 423–426, 2007.

GONÇALVES, P.B.D., OLIVEIRA, M.A.L., MEZZALIRA, A., MONTAGNER, M.M., VISITIN, J.A., COSTA, L.F.C. Produção *in vitro* de embriões. In: Gonçalves, P.B.D., Figueiredo, J.R., Freitas, V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2.ed. São Paulo: **Roca.** cap.14: p. 261-291, 2008.

GOODISON, S., URQUIDI, V., TARIN, D. CD44 cell adhesion molecules. **J. Clin. Pathol.** v.52, p.189-196, 1999.

GRAZUL-BILSKA, A.T., REYNOLDS, L.P., REDMER, D.A. Gap junctions in the ovaries. **Biol. Reprod.** v.57, p. 947-957, 1997.

GARNER, D.L., HAFEZ, E.S.E. Espermatozóides e Plasma Seminal. In: Hafez, B., Hafez, E.S.E. Reprodução animal. 7.ed. São Paulo: **Manole.** cap.7: p.97-103, 2004.

HAFEZ, B., HAFEZ, E.S.E. Fertilização e Clivagem. In: Hafez, B., Hafez, E.S.E. Reprodução animal. 7.ed. São Paulo: **Manole.** cap.8: p.111-126, 2004.

HANSEN, P.J. Interactions between the immune system and the ruminant conceptus. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** v. 49, p.69–82, 1995.

HANSEN, T.R., AUSTIN, K.J., PERRY, D.J., PRU, J.K., TEIXEIRA, M.G., JOHNSON, G.A. Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** v. 54, p. 329–339, 1999.

HOHN, H.P., HUCH, G., TLOLKA, U., DENKER, H.W. Differential expression of CD44 in rabbit uterine epithelium during early pregnancy. **Acta Anat (Basel)**. v. 152, p. 185-194, 1995.

HORNE, A.W., WHITE, J.O., LALANI, E-N. Adhesion molecules and the normal endometrium. **Int. J. Obstet. Gynecol.** v.109, p. 610-617, 2002.

ISACKE, C. M., YARWOOD, H. The hyaluronan receptor, CD44. **The Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 34, p.718–721, 2002.

JOHNSON, G.A., BAZER, F.W., JAEGER, L.A., KA, H., GARLOW, J.E., PFARRER, C., SPENCER, T.E., BURGHARDT, R.C. Muc-1, integrin, and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep. **Biol. Reprod.** v.65, p. 820-28, 2001.

KANEKO, T., SAITO, H., TOYA, M., SATIO, T., NAKAHARA, K., HIROI, M. Hyaluronic acid inhibits apoptosis in granulosa cells via CD44. **J. Assist. Reprod. Genet.** v. 17, p. 162-167, 2000.

KAWAGISHI, R., TAHARA, M., MORISHIGE, K., SAKATA, M., TASAKA, K., IKEDA, W., MORIMOTO, K., TAKAI, Y., MURATA, Y. Expression of nectin-2 in mouse granulosa cells. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.** v.121, p.71-76, 2005.

KAYA, G., LAURINI, R., CHAUBERT, P., GROSS, N. Expression of CD44 and its isoforms in the fetal neuroblasts. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.** v. 9, p. 180-184, 2001.

KIDDER, G.M., MHAWI, A.A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. **Reproduction.** v.123, p. 613-620, 2002.

KIM, H.S., LEE, G.S., HYUN, S.H., NAM, D.H., LEE, S.H., JEONG, Y.W., KIM, S., KIM, J.H., KANG, S.K., LEE, B.C., HWANG, W.S. Embryotropic effect of glycosaminoglycans and receptors in development of porcine pre-implantation embryos. **Theriogenology.** v.63, p. 1167–1180, 2005.

KIMURA, J., YAMADA, H., TSUKISE, A., MORI, Y., ARAI, K. Production and immunohistochemical characterization of specific antibody to oviductal fluid of miniature 'Shiba' goat. **J. Vet. Med. Sci.** v. 57, p. 427-431, 1995.

KIMURA N., HOSHINO Y., TOTSUKAWA K., SATO, E. Cellular and molecular events during oocyte maturation in mammals: molecules of cumulus-oocyte complex matrix and signalling pathways regulating meiotic progression. **Soc. Reprod. Fertil. Suppl.** v. 63, p. 327-342, 2007.

KIMURA, N., Y. KONNO, K. MIYOSHI, H. MATSUMOTO, SATO, E. Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. **Biol. Reprod.** v. 66, p. 707-717, 2002.

KRUIP, T.A.M., CRAN, D.G., VAN BENEDEN, T.H., DIELEMAN, S.J. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. **Gamete Res.** v. 8, p. 29-47, 1983.

KRUIP, T.A.M., VAN REENEN, C.G. New biotechniques and their consequences for farm animal welfare. **Reprod. Dom. Anim.**v.35, p. 247-252, 2000.

LÈNÁRT, P., ELLEMBERG, J. Nuclear dynamics in oocytes: from germinal vesicle breakdown to mitosis. **Cell Biol.** v.15, p.88-95, 2003.

LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S.L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., DARNELL, J. A interação das células nos tecidos. In: *Biologia Celular e Molecular*. 4 ed. Rio de Janeiro: **Revinter**. cap.22: p. 968-1001, 2002.

LOKESHWAR, V.B., IIDA, N., BOURGUIGNON, L.Y. The cell adhesion molecule, GP116, is a new variant (ex14/v10) involved in hyaluronic acid binding and endothelial cell proliferation. **J. Biol. Chem.** v. 271, p. 23853-23864, 1996.

LU, D.P., TIAN, L., O'NEILL, C.O., KING, N.J.C. Regulation of cellular adhesion molecule expression in murine oocytes, peri-implantation and post-implantation embryos. **Cell Research.** v.12, p.373-383, 2002.

MATSUMOTO, H., DAIKOKU, T., WANG, H., SATO, E., DEY, S.K. Differential Expression of Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) and ERM-associated adhesion molecules in the blastocyst and uterus suggests their functions during implantation. **Biol. Reprod.**, v. 70, p. 729-736, 2004.

MIYAKE, Y., MATSUMOTO, H., YOKOO, M., MIYAZAWA, K., KIMURA, N., TUNJUNG, W.A.S., SHIMIZU, T., SASADA, H., ASO, H., YAMAGUSHI, T., SATO, E. Expression and glycosylation with polylactosamine of CD44 antigen on macrophages during follicular atresia in pig ovaries. **Biol. Reprod.** v. 74, p. 501-510, 2006.

OHTA, N., SAITO, H., KUZUMAKI, T., TAKAHASHI, T., ITO, M.M., SAITO, T., NAKAHARA, K., HIROI, M. Expression of CD44 in human cumulus and mural granulosa cells of individual patients in in-vitro fertilization programmes. **Mol. Hum. Reprod.** v. 5, p. 22-28, 1999.

PEREZ-MARTINEZ, M., LUNA, J., MENA, R., ROMANO, M.C. Lymphocytes and T lymphocyte subsets are regionally distributed in the female goat reproductive tract: influence of the stage of the oestrous cycle. **Res. Vet. Sci.** v. 72, p. 115-121, 2002.

PETERS, A.R. Embryo mortality in the cow. **Anim. Breed.** v.64, p.587–598, 1996.

PONTA, H., WAINWRIGHT, D.P. The CD44 protein family. **Int. J. Cell Biol.** v. 30, p.299-305, 1998.

PONTA, H., SHERMAN, L., HERRLICH, P.A. CD44: from adhesion molecules to signaling regulators. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v. 4, p. 33-45, 2003.

ROBERTS, R.M., FARIN, C.E., CROSS, J.C. Trophoblast proteins and maternal recognition of pregnancy. **Oxf. Rev. Reprod. Biol.** v. 12, p.147–180, 1990.

ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. Receptores de membrana para antígenos. In: *Imunologia*. 6.ed. São Paulo: **Manole**. cap.4: p. 124-149 , 2003.

RUFAS, O., FISCH, B., ZIV, S., SHALGI, R. Expression of cadherin adhesion molecules on human gametes. **Mol. Hum. Reprod.** v.6, p 163-169, 2000.



SADLER, T.W. In: Genética Médica. Classificação dos distúrbios genéticos. Disponível em: <<http://www.ufsm.br/blg220/hide/disturclass.htm>>. Acesso em 08 julho. 2008.

SALUSTRI, A., YANAGISHITA, M., UNDERHILL, C.B., LAURENT, T.C., HASCALL, V.C. Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulose cells of the preovulatory follicle. **Dev. Biol.** v. 151, p. 541-551, 1992.

SCHOENFELDER, M., EINSPANIER, R. Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. **Biol. Reprod.** v. 69, p. 269-277, 2003.

SESHAGIRI, P.B., MISHRA, A., RAMESH, G., RAO, R.P. Regulation of peri-attachment embryo development in the golden hamster: role of growth factors. **J. Reprod. Immunol.** v. 53, p. 203–213, 2002.

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

SIRARD, M.A., FLORMAN, H.M., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., BARNES, F.L., SIMS, M.L., FIRST, N.L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biol. Reprod.** v. 40, 1257-63, 1989.

SIRARD, M-A., RICHARD, F., BLONDIN, P., ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology.** v. 65, p. 126-136, 2006.

TAGA, M., SUGINAMI, H. Cell adhesion and Reproduction. **Horm. Res.** v. 50, p. 2-6, 1998.

TAKEICHI, M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. **Annu. Rev. Biochem.** v. 59. p. 237-52, 1990.

TALBOT, P., SHUR, B.D., MYLES, D.G. Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. **Biol. Reprod.** v. 68, p. 1-9. 2003.

THOMPSON, J.G., GARDNER, D.K., PUGH, P.A., MCMILLAN, W.H., TERVIL, H.R. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. **Biol. Reprod.** v. 53, p.1385-1391, 1995.

THORNE, R.F., LEGG, J.W., ISACKE, C.M. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. **J. Cell Sci.** v. 26, p. 373-380, 2004.

THIENTHAI, P., YOKOO, M., KIMURA, N., HELDIN, P., SATO, E., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Immunohistochemical localization and expression of the hyaluronan receptor CD44 in the epithelium of the pig oviduct during oestrus. **Reproduction.** v. 125, p.119-132, 2003.

TOOLE, B.P. Hyaluronan in morphogenesis. **Semin Cell Dev. Biol.** v. 12, p. 79-87, 2001.

TOYOKAWA, K., HARAYAMA, H., MIYAKE, M. Exogenous hyaluronic acid enhances porcine parthenogenetic embryo development in vitro possibly mediated by CD44. **Theriogenology.** v. 64, p. 378-392, 2005.

TURLEY, E.A., NOBLE, P.W., BOURGUIGNON, L.Y.W. Signaling properties of hyaluronan receptors. **J. Biol. Chem.** v. 277, p. 4589-4592, 2001.

VACHON, E., MARTIN, R., PLUMB, J., KWOK, V., VANDIVIER, R.W., GLOGAUER, M., KAPUS, A., WANG, X., CHOW, C.W., GRINSTEIN, S., DOWNEY, G.P. CD44 is a phagocytic receptor. **Blood.** v.107, p. 4149-4158, 2006.

VALCARCEL, A., DE MATOS, D.G., FURNUS, C.C. The hyaluronic acid receptor (CD44) is expressed in bovine oocytes and pre-implantational stage embryos. **Theriogenology.** v. 51, p. 193, 1999.

WAGNER, S.N., WAGNER, C., REINHOLD, U., FUNK, R., ZOLLER, M., GOOS, M. Predominant expression of CD44 splice variant v10 in malignant and reactive human skin lymphocytes. **J. Invest. Dermatol.** v.111, p.464-471, 1998.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: The Physiology of Reproduction. Knobil, E., Neill, J.D.. **Raven Press**, New York, p. 189-317, 1994.

YANAGIMACHI, R., OKADA, A., TUNG, K.S. Sperm autoantigens and fertilization: Effects of anti-guinea pig sperm autoantibodies on sperm-ovum interactions. **Biol. Reprod.** v. 24, p. 512-518, 1981.

YANAGIMACHI, R., USUI, N. Calcium dependence of acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. **Exp. Cell Res.** v. 89, p. 161-174. 1974.

YANG, H., BINNS, R.M. Isolation and characterization of the soluble and membrane-bound porcine CD44 molecules. **Immunology.** v. 78, p. 547–554, 1993.

YANG, X., KUBOTA, C., SUZUKI, H., TANEJA, M., BOLS, P.E., PRESICCE, G.A. Control of oocyte maturation in cows-biological factors. **Theriogenology.** v. 49, p. 471-482, 1998.

YOKOO, M., SHIMIZU, T., KIMURA, N., TUNJUNG, W.A., MATSUMOTO, H., ABE, H., SASADA, H., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., SATO, E. Role of the hyaluronan receptor CD44 during porcine oocyte maturation. **J. Reprod. Dev.** v. 53, p. 263-270, 2007.

YOKOO, M., THIENTA, P., KIMURA, N., NIWA, K., SATO, E., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Localisation of the hyaluronan receptor CD44 in porcine cumulus cells during in vivo and in vitro maturation. **Zygote.** v.10, p. 317-326, 2002.

YOKOO, M., MIYAHAYASHI, Y., NAGANUMA, T., KIMURA, N., SASADA, H., SATO, E. Identification of hyaluronic acid-binding proteins and their expressions in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. **Biol. Reprod.** v. 67, p. 1165–1171, 2002.

## ANEXO I

**RESUMO PUBLICADO:** Uso de anticorpos anti-humano na identificação do receptor CD44 em células de pequenos ruminantes.

Universidade Estadual do Ceará – UECE  
Anais da XII Semana Universitária  
18 a 22 de junho/2007

## USO DE ANTICORPOS ANTI-HUMANO NA IDENTIFICAÇÃO DO RECEPTOR CD44 EM CÉLULAS DE PEQUENOS RUMINANTES

Juliana V. Luz, Maria L.L. Andrade, Mário G. Farias, Agostinho S. Alcântara-Neto, Karlliely C. Almeida, Suely R.G. Avelar.

No campo da reprodução, a expressão do receptor CD44 parece ser decisiva para a maturação dos oócitos, fecundação e implantação embrionária. Diante da crescente aplicação das técnicas de produção *in vitro* (PIV) direcionadas à produção pecuária, surge o interesse pela investigação da expressão desta molécula. As principais ferramentas utilizadas para o estudo da expressão protéica *in situ* consistem nas técnicas de imuno-fluorescência e imuno-histoquímica, todavia, até o presente momento, não foram desenvolvidos anticorpos monoclonais comerciais anti-CD44 direcionados para caprinos e ovinos. O presente estudo objetivou verificar o uso de anticorpos monoclonais anti-CD44 humano na identificação dessa proteína em pequenos ruminantes pelas técnicas de imuno-fluorescência indireta e imuno-histoquímica. Foram obtidos linfócitos do sangue periférico de voluntários humanos (cotrole-positivo), de caprinos e de ovinos através do isolamento por gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque). Procedeu-se a confecção de lâminas por citocentrifugação da suspensão de linfócitos a 30 rpm durante 10 minutos, seguida da fixação em 4% paraformaldeído. Foram utilizados dois diferentes anticorpos monoclonais anti-CD44 humano produzidos em camundongo: o clone A3D8 (1:20; Sigma) e o clone DF1485 (1:40; VisionBiosystems). Na imuno-fluorescência indireta, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários por 16 horas a 4 °C, expostas ao anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com FITC (1:50; Sigma) por 60 min a 25 °C e avaliadas em microscópio de fluorescência (Eclipse E400, NIKON, Japão). Na imuno-histoquímica, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários por 16 horas a 4 °C, expostas ao anticorpo secundário e posteriormente ao complexo SABP (kit LSAB, Dako), ambos por 30 min, reveladas com diaminobenzidina (kit DAB, Dako), contra-coradas com Hematoxilina de Carazzi e avaliadas em microscópio óptico. Foram realizadas 10 replicatas para cada espécie estudada. Observou-se semelhante marcação (quantitativa e qualitativa) entre as amostras de linfócitos humanos e as amostras de linfócitos caprinos e ovinos, notadamente entre as expostas ao clone DF1485. A técnica de imuno-fluorescência confirmou-se como mais sensível enquanto a imuno-histoquímica demonstrando maior praticidade e facilidade na execução e análise. Não observou-se marcação e/ou background entre os controles negativos (não expostos aos anticorpos primários). Dessa forma, conclui-se que os anticorpos anti-CD44 humano A3D8 e DF1485 podem ser utilizados no estudo da expressão desse receptor em células de caprinos e ovinos. Tal constatação incita, entre outras, a perspectiva do estudo da expressão diferencial do CD44 em oócitos e células embrionárias objetivando a otimização das técnicas de FIV em pequenos ruminantes.

Palavras-chave: CD44, linfócitos, pequenos ruminantes.

## ANEXO II

**RESUMO PUBLICADO:** Maturação *in vitro* de oócitos oriundos de cabras e ovelhas sem raça definida criadas no nordeste do Brasil.

Universidade Estadual do Ceará – UECE  
XII Semana Universitária  
18 a 22 de junho/2007

## MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS ORIUNDOS DE CABRAS E OVELHAS SEM RAÇA DEFINIDA CRIADAS NO NORDESTE DO BRASIL

Agostinho S. Alcântara Neto, Maria L.L. Andrade, João B. Cajazeiras, Juliana V. Luz, Karlliely C. Almeida, Raylene R. Moura.

A produção *in vitro* de embriões (PIV) possui potencial para a aplicação no melhoramento genético de rebanhos, bem como no desenvolvimento de outras biotécnicas. Uma etapa importante da PIV é a maturação *in vitro* (MIV), a qual capacita o oócito para fecundação e subsequente desenvolvimento embrionário. Apesar de vários estudos, ainda existem entraves para esta técnica, sendo necessário a utilização de meios eficientes para que esta etapa ocorra com sucesso. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de um protocolo de MIV, já estabelecido em raças exóticas de pequenos ruminantes, em caprinos e ovinos sem raça definida do nordeste brasileiro. Para realizar este experimento, ovários de cabras e ovelhas provenientes de abatedouro foram transportados para laboratório em solução fisiológica a 35 °C e acrescida de antibióticos. Os folículos ovarianos foram puncionados com o auxílio de uma bomba de vácuo (Pioneer Pro-Pump®, GenX international, EUA), sendo os complexos *cumulus*-oócito (CCOs) recuperados em TCM199 tamponado com HEPES e suplementado com heparina e gentamicina. Após a colheita, os CCOs foram selecionados em estereomicroscópio (SMZ-800, Nikon, Japão), onde apenas aqueles oócitos circundados por uma ou mais camadas de células do *cumulus* foram submetidos a maturação. A MIV ocorreu em meio TCM199 suplementado com 100 µM cisteamina, 10 ng/mL de EGF e 4 µL/mL gentamicina, em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, a 38,5 °C e durante um período de 24 h. Ao término da maturação, os CCOs foram desnudados por sucessivas pipetagens, depositados individualmente em lâminas cobertas com poly-L-lisina e imersos em paraformaldeído à 4%. Em seguida, as estruturas foram incubadas com 1 µM de Hoechst 33342. Após a marcação, os oócitos foram visualizados em microscópio de epifluorescência (Eclipse E400, NIKON, Japão) equipado com filtro UV-2E/C e classificados de acordo com seu estágio nuclear: MII (metáfase II ou maturado), VG (vesícula germinativa ou imaturo), DG (degenerados) e NI (não identificado). Dos oócitos ovinos submetidos à maturação, 54,5% (12/22), 18,2% (4/22), 9,1% (2/22) e 18,2% (4/22) se encontravam nos estádios de MII, VG, DG e NI, respectivamente. Já no que diz respeito aos oócitos caprinos, 25% (10/40) se encontravam maturados, 35% (14/40) em estágio de VG, 27,5% (11/40) em DG e 12,5% (5/40) apresentaram seu material genético organizado de forma não identificada. Em conclusão, utilizando-se um protocolo padrão, oócitos ovinos apresentaram melhores taxas de maturação quando comparados aos da espécie caprina.

### ANEXO III

**RESUMO PUBLICADO:** Influência das células do *cumulus* na maturação nuclear de oócitos de pequenos ruminantes.

Anais da XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões (SBTE).  
23 a 26 de agosto/2007



## INFLUÊNCIA DAS CÉLULAS DO CUMULUS NA MATURAÇÃO NUCLEAR DE OÓCITOS DE PEQUENOS RUMINANTES

Luz, J.V.1; Andrade, M.L.L.1; Pereira, A.F.1; Cajazeiras, J.B.1; Sousa, F.C.1; Alcântara Neto, A.S.1; Salles, M.G.F.2; Freitas, V.J.F.1

Uma etapa importante da produção in vitro de embriões (PIV) é a maturação in vitro (MIV), a qual capacita o oócito para fecundação e subsequente desenvolvimento embrionário. Em pequenos ruminantes, têm-se observado que a maioria dos oócitos colhidos apresenta pouca ou nenhuma célula do cumulus. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência da presença de células do cumulus sobre a maturação nuclear de oócitos caprinos e ovinos. Para tanto, ovários de cabras e ovelhas sem raça definida foram obtidos de abatedouros locais e transportados ao laboratório em solução fisiológica acrescida de antibióticos, a 35 °C. Os folículos ovarianos foram puncionados utilizando uma bomba de vácuo (Pioneer Pro-Pump, Guilford, EUA) e os complexos cumulus-oócito (CCOs) foram recuperados em TCM199 modificado. Após a colheita, as estruturas foram selecionadas em estereomicroscópio (Nikon SMZ-800, Kawasaki, Japão) e distribuídas em dois grupos: oócitos circundados por células do cumulus (G1) e oócitos sem células do cumulus (G2). A MIV ocorreu em meio TCM199 suplementado com cisteamina, EGF e gentamicina, a 5% de CO<sub>2</sub> e 38,5 °C, durante 24 h. Ao término da maturação, os CCOs foram depositados individualmente em lâminas cobertas com poly-L-lisina (Polyscience, Inc., Genebra, Suíça) e imersos em paraformaldeído a 4%. Em seguida, as estruturas foram incubadas com 1 µM de Hoechst 33342 (Sigma, St. Louis, EUA), visualizadas em microscópio de epifluorescência (Nikon E-400, Kawasaki, Japão) equipado com filtro UV-2E/C e classificadas de acordo com seu estágio nuclear: MII (metáfase II ou maturado), VG (vesícula germinativa ou imaturo), DG (degenerado) e NI (não identificado). Todos os dados foram expressos em percentual e comparados pelo teste Qui-Quadrado. Dos oócitos ovinos do G1, 33,3% (32/96), 47,9% (46/96), 6,3% (6/96) e 12,5% (12/96) encontravam-se nos estádios de MII, VG, DG e NI, respectivamente. Quanto àqueles do G2, os seguintes resultados foram obtidos para MII: 10,4% (7/67); VG: 61,2% (41/67); DG: 17,9% (12/67) e NI: 10,4% (7/67). Para os oócitos caprinos, os valores encontrados para os grupos G1 e G2 foram, respectivamente: 48,9% (65/133) e 28,6% (28/133) em MII; 33,8% (45/133) e 33,7% (33/133) em VG; 8,3% (11/133) e 29,6% (29/133) DG; 9,0% (12/133) e 8,2% (8/133) NI. Em ambas as espécies, os estádios de MII e DG diferiram significativamente quanto da comparação entre grupos ( $P < 0,05$ ). Em conclusão, verificou-se que a presença de células do cumulus na etapa de MIV aumenta a taxa de oócitos maturados.

Área: Produção in vitro de embriões (PIV)

## ANEXO IV

**RESUMO ACEITO:** Expressão da molécula de adesão celular, CD44, em oócitos e embriões ovinos (*Ovis aries*).

XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões (SBTE).  
21 a 24 de agosto/2008

## EXPRESSÃO DA MOLÉCULA DE ADESÃO CELULAR, CD44, EM OÓCITOS E EMBRIÕES OVINOS (*Ovis aries*)

Alcântara Neto, A.S.; Luz, J.V.; Avelar, S.R.G.; Melo, L.M.; Freitas, V.J.F.

O CD44 é uma molécula de superfície expressa em uma variedade de populações celulares. Como uma importante molécula de adesão, CD44 é envolvido em atividades fisiológicas, como interações célula-célula e célula-matriz extracelular. Apesar destas abordagens, a natureza e funções desse receptor são pobremente compreendidas em ovinos. Assim, este estudo objetivou investigar a presença do CD44 em oócitos e embriões desta espécie. Os oócitos imaturos foram obtidos de 11 ovelhas sem padrão racial definido (SPRD), provenientes de abatedouro. Oócitos maturados foram obtidos de seis ovelhas SPRD tratadas para sincronização de estro com esponjas intravaginais de acetato de medroxiprogesterona (Progespon, Buenos Aires, Argentina) por 14 dias. O tratamento superovulatório foi iniciado 48 h antes da retirada da esponja e consistiu de aplicação i.m. de 150 mg de pFSH (Folltropin-V, Ontario, Canadá) administrados em seis doses decrescentes intervaladas de 12 h. A colheita dos oócitos foi realizada por laparotomia, seguida de lavagem ovidutária, às 96 h após a retirada da esponja. Para a obtenção de embriões, outras seis ovelhas SPRD foram submetidas ao mesmo tratamento hormonal descrito anteriormente seguido de monta natural ao início do estro e 24 h depois, utilizando dois carneiros férteis. A colheita de embriões foi realizada sete dias após o estro através de laparotomia e posterior lavagem uterina. Todas as estruturas colhidas (oócitos imaturos, oócitos maturados e embriões) foram aderidas a lâminas de poly-L-lisina (Polyscience Inc., Genebra, Suíça), fixadas em paraformaldeído 4% e permeabilizadas com Triton X-100. Após lavagens em PBS, as células foram incubadas com anticorpo monoclonal (mAb) anti-CD44 humano, clone DF1485 (VisionBiosystems, Newcastle, UK) diluído a 1:40 em PBS-BSA a 25°C por 3 h. Após lavagens com PBS, as amostras foram incubadas com anticorpo anti-IgG murina conjugado com FITC (Sigma, St. Louis, EUA), diluído a 1:100 em PBS-BSA, a 25°C por 1 h. As lâminas também foram coradas com o marcador fluorescente Hoechst 33342 (Sigma, St. Louis, EUA) na concentração de 1µg/mL, por 15 min a 37 °C. As lâminas foram montadas com glicerol a 90% e 10% de PBS e observadas em microscópio sob iluminação de fluorescência (Nikon E400, Tóquio, Japão), usando um filtro B-2A para FITC (450-490 nm) e um filtro UV-2A para Hoechst (330-380 nm). Linfócitos humanos e oócitos bovinos imaturos foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. A coloração com Hoechst permitiu a visualização da vesícula germinativa em oócitos imaturos, a placa metafásica e o corpúsculo polar em oócitos maturados, bem como a contagem do número de núcleos em embriões em estágio pré-implantacional. Assim, os embriões obtidos foram classificados como mórulas compactas. Quanto à verificação do CD44 em oócitos imaturos, nenhuma marcação fluorescente para FITC foi observada. Já em oócitos maturados e embriões, o sinal de fluorescência apresentou distribuição homogênea e foi mais intenso nos primeiros. A investigação do CD44 por imunofluorescência indireta, em oócitos e embriões ovinos, permitiu inferir que: a) o receptor CD44 ovino reage cruzadamente com mAb anti-CD44 humano, clone DF1485; b) esse receptor começa a ser expresso após a maturação oocitária, continuando durante o desenvolvimento embrionário precoce.

Área: Fisiologia

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)