

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**EXPRESSÃO DO GRB10 DURANTE O
CRESCIMENTO FOLICULAR EM BOVINOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rodrigo Camponogara Bohrer

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**EXPRESSÃO DO GRB10 DURANTE O CRESCIMENTO
FOLICULAR EM BOVINOS**

por

Rodrigo Camponogara Bohrer

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Fisiopatologia da Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Paulo Bayard Dias Gonçalves

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

Expressão do Grb10 durante o crescimento folicular em bovinos

elaborada por
Rodrigo Camponogara Bohrer

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Paulo Bayard Dias Gonçalves, PhD.
(Presidente/Orientador)

Luiz Ernani Henkes (UNIPAMPA)

Vilceu Bordignon (McGill University)

Santa Maria, 5 de maio de 2011

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio e incentivo constante durante toda a minha vida, pela educação que me deram e por servir de exemplo de pessoas dignas e caráter incontestável.

Ao meu primo Gustavo, pela amizade e companheirismo e também por estar sempre disposto a emprestar animais para realização dos experimentos.

Ao meu orientador Paulo Bayard Dias Gonçalves, por todos os ensinamentos transmitidos durante esses seis anos de convívio, sendo para mim um exemplo de pesquisador por sua dedicação, por seu caráter, por sua inteligência e pela sua capacidade de transmitir seus conhecimentos à seus alunos.

Ao professor João Francisco Coelho de Oliveira pela sua colaboração na realização deste trabalho e também pelos ensinamentos, respeito profissional e grande amizade.

Ao professor Vilceu Bordignon, pela sua colaboração na realização deste trabalho e por todos os ensinamentos durante meu estágio curricular e também durante nossa convivência no BioRep.

À família BioRep, que contribuiu para minha formação durante a minha graduação e pós-graduação.

À todos os alunos de graduação e pós-graduação que de alguma forma contribuíram para a realização dos experimentos durante meu mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq) pelo apoio financeiro, possibilitando a realização dos experimentos.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de formação em Medicina Veterinária, proporcionando um ensino gratuito e de qualidade.

Ao programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da UFSM, pela oportunidade de formação em uma das melhores pós-graduações em Medicina Veterinária do Brasil.

À Deus, pela minha vida.

**"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim."**

(Chico Xavier)

**“Não chore pelas coisas terem terminado,
sorria por que elas existiram.”**

(Luiz E. Boldakian)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

EXPRESSÃO DO GRB10 DURANTE O CRESCIMENTO FOLICULAR EM BOVINOS

Autor: Rodrigo Camponogara Bohrer

Orientador: Paulo Bayard Dias Gonçalves

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 5 de maio de 2011

A proteína de ligação Grb10 é extensivamente estudada em humanos onde atua regulando a rotas intracelulares do MAPK e do PI3K, ativadas pelos receptores do IGF-I. Em bovinos, está bem estabelecido que o sistema IGF é indispensável para a divergência folicular e seleção do folículo dominante. Porém, a proteína Grb10 ainda não foi estudada no desenvolvimento folicular, dominância ou divergência de nenhuma espécie. Por isso, experimentos foram conduzidos para caracterizar o Grb10 em células foliculares e para avaliar a regulação da expressão do RNAm para o Grb10 durante a divergência folicular. Ovários bovinos foram obtidos a partir de abatedouro, transportado até o laboratório em gelo e imediatamente processados. Células da granulosa e da teca coletadas de folículos de 3-5 mm, 6-8 mm e >8 mm de diâmetro expressaram RNAm e proteína para o Grb10. Utilizando a técnica de Western blot, nas células da granulosa foi obtida uma banda, enquanto que nas células da teca foram verificadas três bandas. Imagens em microscópio confocal demonstraram a presença da proteína Grb10 no citoplasma das células da granulosa e da teca. Após a caracterização da mensagem e da proteína para o Grb10 nas células foliculares, nós estudamos a regulação do Grb10 nas células foliculares durante a divergência folicular *in vivo*. Foi observada uma maior expressão de RNAm para o Grb10 em folículos subordinados em relação os folículos dominantes ($P < 0.05$) e também uma correlação negativa entre a expressão de Grb10 e aromatase durante a divergência folicular ($P < 0.05$). Em nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho a demonstrar a expressão de Grb10 em células da granulosa e da teca durante o desenvolvimento folicular. Além disso, os resultados indicam

fortes evidências de que a expressão de RNAm para o Grb10 é regulado durante a divergência folicular e, portanto, está potencialmente envolvido na seleção do folículo dominante em bovinos.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

THE GRB10 EXPRESSION DURING FOLLICULAR DEVELOPMENT IN CATTLE

Autor: Rodrigo Camponogara Bohrer

Orientador: Paulo Bayard Dias Gonçalves

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 5 de maio de 2011

The growth factor receptor-bound protein 10 (Grb10) has been extensively studied in human and has been implicated in the regulation of MAPK and PI3K pathways, activated by Insulin-like Growth Factor Receptor (IGF-IR). In cattle, it is well established that the IGF system is required for follicular dominance. On the other hand, Grb10 protein has not been studied in follicular development, dominance or deviation of any species. Then, we conducted experiments to characterize the Grb10 in ovarian follicular cells and to evaluate the regulation of Grb10 mRNA expression during follicular deviation. Cow ovaries were obtained from an abattoir, transported to the laboratory on ice and processed immediately. Granulosa and theca cells collected from follicles of 3-5 mm, 6-8 mm and > 8 mm of diameter expressed Grb10 mRNA and protein. Western blot assay from granulosa cells lysates showed a single band while three bands were observed in theca cells. The confocal study demonstrated presence of Grb10 in the cytoplasm of theca and granulosa cells. After characterize the Grb10 message and protein in follicular cells, we studied the regulation of Grb10 in follicular cells during deviation *in vivo*. Higher Grb10 mRNA expression was observed in subordinate follicles when compared to the dominant follicle ($P < 0.05$) as well as a negative correlation between Grb10 and aromatase throughout the follicular deviation ($P < 0.05$). To our knowledge, this is the first report of Grb10 expression in granulosa and theca cells during follicular development. Moreover, the results present strong evidence that Grb10 mRNA expression is regulated during follicle deviation and, therefore, is potentially involved in the selection of dominant follicle in cattle.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Detecção de Grb10 em diferentes tipos celulares através da técnica de Western blot. A – As amostras 3-5, 6-8 e >8 de células da granulosa e da teca foram coletadas de ovários obtidos em abatedouro e representam, respectivamente, folículos antes da divergência (3-5 mm de diâmetro), durante a divergência (6-8 mm de diâmetro) e após a divergência (>8 mm de diâmetro) . B – 1 e 2 representam amostras diferentes de fígado humano e bovino, utilizados como controle positivo..... 40
- FIGURA 2 – Imagens de microscopia confocal de folículos bovinos. A – Controle negativo. B – Núcleo das células foliculares marcadas com DAPI (azul). C – Proteína Grb10 nas células foliculares marcadas com o anticorpo secundário Alexa 488 (verde). D – Sobreposição das imagens B e C evidenciando a proteína Grb10 no citoplasma (verde) e núcleo corado em azul pelo DAPI. Escala de 100 µm nas figuras grandes e de 10 µm nas figuras pequenas (quadrados grandes 20x e quadrado pequeno 60x). 41
- FIGURA 3 – Expressão de RNAm em células da granulosa (A) e da teca (B) de folículos bovinos em diferentes momentos da divergência folicular *in vivo* (D2 – antes da divergência, D3 – durante a divergência, D4 – depois da divergência). Barras brancas representam células de folículos dominantes e barras pretas representam células de folículos subordinados. Asterisco indica diferença significativa entre folículos dominantes e subordinados no mesmo dia (* P<0,05). 42
- FIGURA 4 – Correlação entre a expressão de RNAm para o Grb10 e aromatase em células da granulosa de folículos bovinos obtidos *in vivo* durante os dias 2, 3, e 4 da onda folicular. (P=0,0287). 43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Lista dos iniciadores utilizados para a análise da expressão através da técnica de PCR em tempo real. Ciclofilina foi utilizada como gene <i>Housekeeping</i>	39
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt: serina/treonina proteína quinase

BPS: Domínio da proteína Grb10, “between the PH and SH2 domains”

cDNA: DNA complementar

CYP17A1: Enzima 17 α -hidroxilase

CYP19A1: Enzima aromatase

DAPI: 4',6-diamidino-2- phenylindole

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DNase: Desoxirribonuclease

dNTP: Desoxirribonucleotídio

EDTA: Acido etilendiaminotetraacetico

EGFR: Receptor para o Fator de Crescimento Epidermal

Erk1: “Extracellular regulated kinase 1”

Erk2: “Extracellular regulated kinase 2”

FGFR: Receptor para o Fator de Crescimento Fibroblástico

FSH: Hormônio Folículo Estimulante

GDP: Guanina Difosfato

GH: Hormônio do Crescimento

GIGYF1: “Grb10 Interacting GYF Protein 1”

GIGYF2: “Grb10 Interacting GYF Protein 2”

GRB2: “Growth factor receptor binding protein-2”

Grb7: “Growth factor receptor-bound protein 7”

Grb10: “Growth factor receptor-bound protein 10”

Grb14: “Growth factor receptor-bound protein 14”

GTP: Guanina Trifosfato

hGrb10: Grb10 humano

IGFBP: Proteína de ligação ao IGF

IGF-I: Fator-I de Crescimento Semelhante à Insulina

IGF-II: Fator-II de Crescimento Semelhante à Insulina

IGF-IR: Receptor para o IGF-I

IGF-IIR: Receptor para o IGF-II

IGF-R: Receptor de IGF
IRS: Substratos endógenos dos receptores de insulina
LH: Hormônio Luteinizante
M6P: Manose-6-fosfato
MAPK: “Mitogen-activated protein kinase”
mg: Miligrama
mGrb10: Grb10 de camundongo
mm: Milímetro
mM: Milimolar
mm³: Milímetro Cúbico
NaCl: Cloreto de Sódio
Need4: “Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4”
NIH - 3T3: Linhagem de células fibroblásticas embrionárias de camundongo
nm: Nanometro
nM: Nanomolar
NPEY: Região na subunidade β do receptor de IGF-I
P: Domínio da proteína Grb10, “Proline-rich region”
p85: “Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit”, proteína adaptadora envolvida na sinalização intracelular
PAPP-A: Proteína Plasmática Associada à Prenhez
PBS: Solução Salina Fosfatada Tamponada
PH: Domínio da proteína Grb10, “pleckstrin homology”
PI3`-K: “Phosphatidylinositol 3-kinase”
PMSF: Phenylmethanesulfonylfluoride
RA: Domínio da proteína Grb10, “Ras-association”
Ras: Abreviatura de “RAr Sarcoma”, proteína envolvida na sinalização intracelular
RNAm: RNA mensageiro
RT: Transcrição Reversa
RTK: Receptor do tipo tirosina kinase
RT-PCR: Reação da Polimerase em Cadeia em Tempo Real
SH2: Domínio da proteína Grb10, “Src homology 2”
Shc: “Src homology collagen”, proteína envolvida na sinalização intracelular
siRNA: RNA de Interferência

SOS: “Son of Sevenless”, proteína envolvida na sinalização intracelular

Tris-HCl: Trizma hydrochloride

U: Unidade

VEGFR: Receptor para o Fator de Crescimento Epidermal

μ l: Microlitro

μ m: Micrômetro

μ M: Micromolar

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
EPIÍGRAFE	5
RESUMO	6
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
SUMÁRIO	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. Divergência Folicular	16
2.2. Sistema IGF	17
2.2.1. Fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I).....	17
2.2.2. Expressão do IGF-I e de seu receptor nas células foliculares	18
2.2.3. Participação do sistema IGF na divergência folicular	18
2.2.4. Ativação dos receptores de IGF-I e suas rotas intracelulares	19
2.3. Proteína Grb10	21
2.3.1. Genes e Isoformas	22
2.3.2. Expressão do Grb10 em diferentes espécies animais	23
2.3.3. Regulação dos receptores de IGF-I pela proteína Grb10	24
3. CAPÍTULO 1	26
4. CONCLUSÃO	47
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

INTRODUÇÃO

Durante a onda de crescimento folicular em bovinos, a partir de um grupo de folículos que foram recrutados e estão em crescimento, ocorre a seleção de um folículo para se tornar dominante, esse evento é chamado de divergência folicular. O futuro folículo dominante possui a capacidade de continuar seu crescimento apesar das baixas concentrações plasmáticas de FSH (EVANS & FORTUNE, 1997). Para isso, o folículo dominante deve possuir maior quantidade de IGF-I livre no fluido folicular e conseqüentemente ser mais sensível à ação das gonadotrofinas. Neste contexto, o sistema IGF é de extrema importância para o desenvolvimento folicular e seleção do folículo dominante (MIHM et al., 1997).

A ligação dos IGF-I à seu receptor do tipo tirosina quinase leva a ativação de duas principais rotas intracelulares que são as rotas do PI3`-K (“*phosphatidylinositol 3-kinase*”) e do MAPK (“*Mitogen-activated protein kinase*”). A ativação dessas rotas intracelulares são indispensáveis para a seleção do folículo dominante durante a divergência folicular (EVANS & MARTIN, 2000; RYAN et al., 2007). Adicionalmente, essas rotas intracelulares são responsáveis pela ativação de fatores de transcrição nucleares que levam à alteração na expressão de vários genes responsivos ao IGF-I. Como resultado da ação do IGF, ocorre proliferação e diferenciação celular e inibição da apoptose (LEROITH et al., 1995).

Em humanos, as rotas intracelulares ativadas pelo IGF-I vêm sendo bastante estudadas para um melhor entendimento da sinalização intracelular desse fator de crescimento. Nessa espécie, DUFRESNE & SMITH (2005) demonstraram que a proteína Grb10 (“*Growth factor receptor-bound protein 10*”) atua regulando negativamente a ativação das rotas intracelulares do PI3`-K e do MAPK. Dessa forma, a proteína Grb10 possui papel chave na regulação da ação do IGF-I. Porém, na espécie bovina ainda não existem na literatura trabalhos estudando esta proteína na regulação das rotas intracelulares ativadas pelo IGF-I. Considerando que o sistema IGF é de extrema importância para a seleção e desenvolvimento do folículo dominante durante a divergência folicular, o estudo da proteína Grb10 na fisiologia reprodutiva de bovinos é de grande relevância. Com isso, nossa hipótese é que o Grb10 seja menos expresso em folículos dominantes e participa da seleção folicular durante a divergência folicular em bovinos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi demonstrar a expressão do Grb10 em células foliculares e avaliar a regulação da expressão dessa proteína durante a divergência folicular em bovinos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Divergência Folicular

O ciclo estral de fêmeas bovinas é o período entre duas ovulações, possuindo duração média de 21 dias. A ultrassonografia transretal tem demonstrado que a maioria das fêmeas bovinas possuem duas ou três ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral (GINTHER et al., 1989). Nessa espécie, em uma onda de crescimento folicular, ocorre a emergência e o desenvolvimento síncrono de um grupo de folículos (SIROIS & FORTUNE, 1988). A partir desse grupo de folículos ocorre a seleção de um folículo dominante que irá continuar crescendo e os demais folículos subordinados irão entrar em atresia, sendo este evento denominado de divergência folicular (GINTHER et al., 1996)..

Na emergência folicular um grupo de folículos de aproximadamente 4 mm de diâmetro são recrutados em resposta a altos níveis plasmáticos de FSH (ADAMS et al., 1992). Quando esses folículos em crescimento atingem aproximadamente 5 mm de diâmetro ocorre uma diminuição na síntese de FSH (GIBBONS et al., 1997) devido a produção de estradiol (EVANS & FORTUNE, 1997) e inibina (MIHM et al., 1997). Apesar das baixas concentrações plasmáticas de FSH, o futuro folículo dominante deve continuar crescendo até o momento em que adquire receptores para LH nas células da granulosa, e com isso, torna-se menos dependente de FSH para seu desenvolvimento até o estágio pré-ovulatório. Trabalhos têm demonstrado que as células da granulosa obtidas de folículos a partir de 8 mm de diâmetro expressam receptores para LH (XU et al., 1995; BAO et al., 1997) e ao longo da divergência folicular essa expressão aumenta no folículo dominante, porém se mantém constante no folículo subordinado (BEG et al., 2001). Por outro lado, os futuros folículos subordinados param de crescer devido às baixas concentrações de FSH e entram em atresia (GINTHER et al., 1999).

A divergência folicular em bovinos ocorre a partir do dia 2 da onda de crescimento folicular, considerando o dia 0 como, retrospectivamente, o último dia em que o folículo dominante era menor que 5 mm de diâmetro. No dia 2 da onda de crescimento folicular, o folículo dominante começa a se tornar maior que o folículo subordinado e, além disso, o folículo dominante já possui maior concentração intrafolicular de estradiol que o folículo subordinado. No dia 3 da onda de crescimento folicular, a dominância já está estabelecida com o folículo dominante possuindo aproximadamente 10 mm e o folículo subordinado aproximadamente 7 mm de diâmetro (EVANS & FORTUNE, 1997). Nesse contexto, o

sistema IGF-I participa da seleção folicular, possibilitando o crescimento do futuro folículo dominante mesmo em baixas concentrações de FSH (MIHM et al., 1997).

2.2. Sistema IGF

O sistema IGF é composto pelos ligantes IGF-I e IGF-II, pelos receptores I e II (IGF-IR e IGF-IIR), pelas seis proteínas de ligação (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 e -6) e pela protease PAPP-A (“Pregnancy-associated plasma protein-A”). O receptor tipo I (IGF-IR) é o principal receptor e medeia a maioria das ações biológicas do IGF-I e do IGF-II, como proliferação e diferenciação celular e inibição da apoptose. Enquanto o receptor tipo II, IGF-IIR ou M6P (Manose-6-fosfato) liga-se ao IGF-II e à moléculas que possuem o resíduo M6P, como enzimas lisossomais e ao Fator de Crescimento e Transformação β (TGF- β). Uma das principais funções do IGF-IIR é regular negativamente a biodisponibilidade do IGF-II (LEROITH et al., 1995).

2.2.1. Fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I)

Inicialmente o IGF-I foi nomeado como somatomedina C por sua habilidade de mediar a ação do hormônio do crescimento (GH) e promover o crescimento somático. Duas décadas mais tarde, essa somatomedina foi renomeada para IGF-I (KLAPPER et al., 1983). Essa proteína de 70 aminoácidos (RINDERKNECHT & HUMBEL, 1978) foi denominada de “insulin-like” por possuir funções semelhantes à molécula de insulina, como por exemplo, promover o consumo de insulina em tecido adiposo (RINDERKNECHT & HUMBEL, 1976).

Inicialmente se acreditava que o IGF-I era produzido somente pelo fígado e distribuído para os demais tecidos onde desempenhava sua função endócrina. Posteriormente, pesquisadores descobriram que esse fator de crescimento era produzido por muitos, senão todos, os tecidos (D'ERCOLE et al., 1980). Em células ovarianas, os primeiros trabalhos mostrando a ação do IGF-I, na época identificado como somatomedina C, foram nas células da granulosa estimulando a proliferação celular (SAVION et al., 1981), a esteroidogênese e a diferenciação celular (ADASHI et al., 1984).

2.2.2. Expressão do IGF-I e de seu receptor nas células foliculares

Em ovinos, o IGF-IR é expresso em folículos primários e essa expressão aumenta até o folículo atingir 1 mm de diâmetro (PERKS et al., 1995), porém se mantém constante durante o desenvolvimento do folículo de 1 mm até a fase pré-ovulatória (MONGET et al., 1989). Porém, em bovinos a expressão de IGF-IR aumenta de folículo primário até folículos antrais dependentes de gonadotrofinas. Nessa espécie, o aumento da expressão do IGF-IR ocorre concomitante com o aumento da expressão de receptores para FSH e LH durante as fases iniciais de crescimento dos folículos antrais obtidos de fetos e neonatos bovinos (WANDJI et al., 1992). Além disso, em animais adultos durante a onda de crescimento folicular, foi detectada a expressão de RNAm e proteína para o IGF-I e para o IGF-IR em células da granulosa e da teca (SCHAMS et al., 2002). Apesar do IGF-IR ser expresso durante todas as fases do desenvolvimento folicular, o IGF-I não foi detectado em todas as fases de desenvolvimento do folículo e, por isso, sugere-se que ele também seja derivado da circulação sanguínea (SUDO et al., 2007). Com isso, o complexo sistêmico IGFBP-IGF de 150kDa, que transporta mais de 90% da produção hepática de IGFs no soro, também pode ser responsável por transportar o IGF-I para dentro do folículo (HODGKINSON et al., 1991).

2.2.3. Participação do sistema IGF na divergência folicular

As funções autocrina-paracrina do IGF-I e IGF-II no ovário incluem proliferação celular e aumento da produção de estradiol, atuando como um amplificador da ação das gonadotrofinas nas células foliculares (SPICER & ECHTERNKAMP, 1995). Em sistemas de cultivo *in vitro*, o IGF-I estimula a produção de estradiol pelas células da granulosa e a proliferação e diferenciação das células da granulosa e da teca (SPICER et al., 1993; SPICER & ECHTERNKAMP, 1995; GUTIÉRREZ et al., 1997). Estudos *in vitro* e *in vivo*, na espécie bovina, têm demonstrado a participação direta do IGF-I e suas IGFBPs na dinâmica folicular, sendo esses os principais responsáveis pela divergência e posterior dominância folicular (RIVERA et al., 2001; RIVERA & FORTUNE, 2001; RIVERA & FORTUNE, 2003; GINTHER et al., 2004). Nesse contexto, a ligação do IGF-I à seu receptor (IGF-IR) é modulado pelas proteínas IGFBPs. Essas IGFBPs se ligam ao IGF-I livre impossibilitando a ligação do IGF-I à seu receptor (SPICER & ECHTERNKAMP, 1995). Tem sido relatado o aumento do IGF-I livre no fluido folicular de folículos dominantes quando comparados aos subordinados (RIVERA & FORTUNE, 2003). Esse aumento ocorre devido a mudanças na

expressão de genes das IGFbps (ARMSTRONG et al., 1998) e pela proteólise das IGFbps (RIVERA & FORTUNE, 2001).

A proteína PAPP-A é uma metaloproteinase de 200kDa identificada como uma protease para o IGFbp-4 e como um importante regulador da biodisponibilidade do IGF-I. A expressão do RNAm para a PAPP-A foi detectada em células da granulosa e da teca em bovinos e a proteína foi também detectada no fluido folicular (MAZERBOURG et al., 2001; RIVERA & FORTUNE, 2003). Nessa espécie, a enzima PAPP-A cliva a proteína IGFbp-4 que se encontra ligada ao IGF-I e desta forma resulta no aumento do IGF-I livre no ambiente folicular. O IGF-I livre torna-se capaz de se ligar a seus receptores na membrana das células foliculares e essa biodisponibilidade está diretamente relacionada com a dominância folicular (RIVERA et al., 2001). Trabalhos têm demonstrado que a atividade da enzima PAPP-A é induzida pelo hormônio FSH (RIVERA & FORTUNE, 2001; SUDO et al., 2007) e também está relacionada com o aumento da produção de estrógeno durante o desenvolvimento folicular (SANTIAGO et al., 2005).

2.2.4. Ativação dos receptores de IGF-I e suas rotas intracelulares

O receptor do tipo tirosina quinase IGF-IR é composto pelas subunidades α e β , sendo ligadas por pontes de dissulfato e possuindo uma configuração $\alpha_2\beta_2$ (LEROITH et al., 1995). A subunidade α se localiza na porção extracelular e a subunidade β se localiza na membrana com grande parte na porção intracelular (STEELE-PERKINS et al., 1988). A ligação do IGF-I a subunidade α do receptor do tipo tirosina quinase resulta na autofosforilação de resíduos de tirosina localizados na subunidade β durante a ativação dos receptores de IGF-I (SASAKI et al., 1985). Após a ativação os substratos endógenos IRS (IRS-1 a 4) e Shc são recrutados para os resíduos fosforilados (LE ROITH et al., 2001). O Shc e o IRS se ligam a região NPEY (Asn-Pro-Glu-Tyr) na subunidade β do receptor de IGF-I e além dessa ligação o IRS liga-se também aos sítios de tirosina autofosforilados (Tyr-1131, Tyr-1135 e Tyr-1136) localizado também na subunidade β do receptor de IGF-I (SASAKI et al., 1985; TARTARE-DECKERT et al., 1995). Com essas ligações ocorre o recrutamento de outros substratos que são essenciais para a ativação de rotas intracelulares. Entre eles estão a subunidade p85, que se liga ao IRS e leva a ativação da rota intracelular do PI3`-K (“*phosphatidylinositol 3-kinase*”) e conseqüentemente ativação do Akt (D’MELLO et al., 1997). Outro substrato é o Grb2 (“*growth factor receptor binding protein-2*”) que se liga ao Shc ativado e isso desencadeia a

associação do Grb2 à proteína SOS resultando na fosforilação do Ras-GDP em Ras-GTP. Essa ativação do Ras resulta na fosforilação das proteínas Erk1 e Erk2 (“Extracellular-regulated kinase”) ativando a rota da MAPK (“Mitogen-activated protein kinase”) (SASAOKA et al., 1994). As rotas intracelulares ativadas pelos receptores de IGF-I estão ilustradas na figura 1. A ativação das rotas intracelulares do PI3`-K e da MAPK ativa fatores de transcrição nucleares levando à alteração da expressão de vários genes responsivos ao IGF-I que irá resultar nos efeitos biológicos causados pelo IGF-I como proliferação e diferenciação celular e inibição da apoptose (LEROITH et al., 1995).

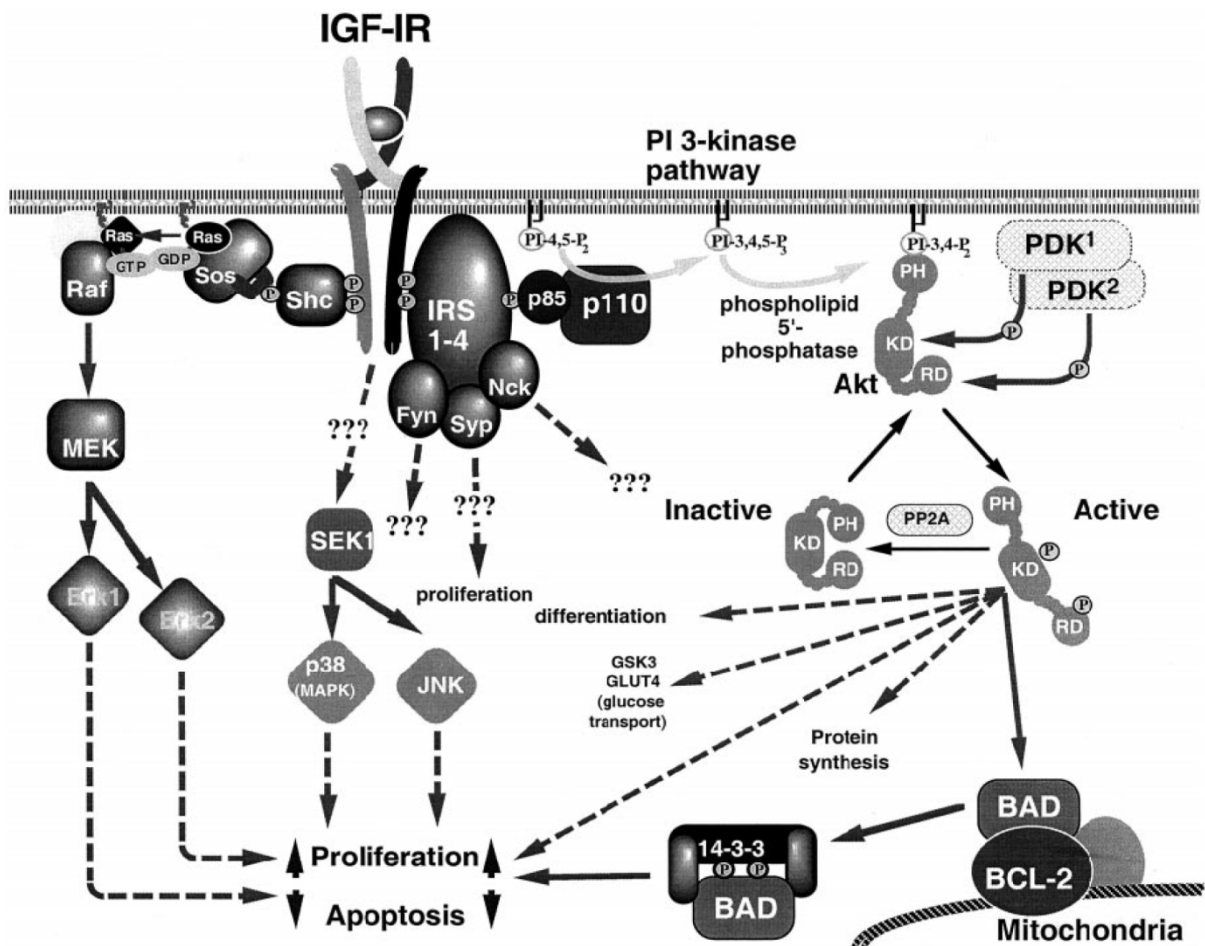


Figura 1 – Rotas intracelulares ativadas pelos receptores de IGF-I. Após a autofosforilação dos receptores de IGF-I as moléculas de Shc e IRS se ligam à região intracelular dos receptores de IGF-I. A fosforilação das moléculas de Shc e IRS leva a formação de sítios de ligação para proteínas que participam da cascata de sinalização intracelular, como o Grb2 e p85. Esses levam a ativação das rotas intracelulares da MAPK e do PI3`-K. Modelo descrito por LEROITH et al., 1995.

Na fisiologia reprodutiva de fêmeas bovinas, trabalhos têm demonstrado que as rotas intracelulares ativadas pelos receptores de IGF-I são importantes para a seleção do folículo dominante durante a divergência folicular. Já se demonstrou que folículos dominantes possuem maior quantidade das proteínas Akt, Erk1 e Erk2 quando comparados aos folículos subordinados e, além disso, a forma ativa, ou fosforilada, dessas proteínas somente é encontrada em folículos dominantes (EVANS & MARTIN, 2000). Trabalhos têm também demonstrado que através do perfil dessas proteínas nas células da granulosa e da teca, é possível identificar os futuros folículos dominantes e os futuros folículos subordinados antes de se observar diferenças em tamanho folicular, ou seja, essas rotas intracelulares são de extrema importância para a seleção do folículo dominante a partir dos momentos iniciais da divergência folicular (RYAN et al., 2007). Apesar das rotas intracelulares ativadas pelo IGF-I, MAPK e PI3`-K, serem responsáveis por estimular a proliferação e diferenciação celular, demonstrou-se que somente a rota intracelular do PI3`-K atua inibindo a apoptose em células da granulosa (HU et al., 2004).

2.3. Proteína Grb10

A proteína Grb10 (“Growth factor receptor-bound protein 10”) pertence à Família de Proteínas de Ligação Grb7, que é constituída pelas proteínas Grb7, Grb10 e Grb14 (DALY, 1998). Essa proteína é bastante estudada na espécie humana, onde possui grande importância regulando a ativação de rotas intracelulares ativadas pelos receptores do tipo tirosina quinase. Dentre esses receptores, os mais estudados são os Receptores de Insulina, receptores para o Fator de Crescimento Ligado a Insulina (IGF-IR), receptores para o Fator de Crescimento Fibroblástico (FGFR), receptores para o Fator de Crescimento Epidermal (EGFR) e os receptores para o Fator de Crescimento Endotelial (VEGFR). A maioria das pesquisas utilizam linhagens celulares da espécie humana para estudar a participação dessas proteínas de ligação no desenvolvimento de tumores responsivos ao IGF-I, metabolismo da insulina e diabetes e anormalidades de crescimento (MCCANN et al., 2001; LIM et al., 2004; DI PAOLA et al., 2006).

A proteína Grb10 é formada pelos domínios SH2 (“*Src homology 2*”), PH (“*pleckstrin homology*”), BPS (“*between the PH and SH2 domains*”), P (“*Proline-rich region*”) e RA

(“*Ras-association*”) (HOLT & SIDDLE, 2005). O domínio SH2 se localiza na região C-terminal sendo importante para as interações com os receptores do tipo tirosina quinase e outras proteínas de sinalização intracelular (HANSEN et al., 1996). O domínio BPS possui aproximadamente 80 aminoácidos e se localiza entre os domínios PH e SH2, sendo nomeado “BPS” por essa localização (“Between the PH and SH2 Domains”) (HE et al., 1998). Esse domínio possui a função de se ligar aos receptores ativados de Insulina e IGF-I, juntamente como o domínio SH2 (HANSEN et al., 1996) e inibir a sinalização intracelular promovida pela ativação desses receptores (STEIN et al., 2001). O domínio PH se localiza entre os domínios BPS e RA, facilitando a localização dessa proteína na membrana plasmática da célula através de sua interação com fosfolípidios da membrana (LEMMON & FERGUSON, 2000). O domínio RA está localizado entre os domínios PH e P, e sugere-se que este domínio permita a ligação de proteínas da superfamília Ras (regulam rotas intracelulares que controlam múltiplos processos biológicos na célula) à proteína Grb10 (RODRIGUEZ-VICIANA et al., 2004). Por último, o domínio P está localizado na região N-terminal e trabalhos tem demonstrado que as proteínas GIGYF1 e GIGYF2 (“Grb10 interacting GYF protein 1 e 2”) se associam a este domínio. Além disso, a estimulação com IGF-I aumenta essa associação, porém ainda não se sabe a função biológica dessa interação (GIOVANNONE et al., 2003).

A proteína Grb10 se encontra localizada no citoplasma celular em uma forma inativa. Após a ativação dos receptores tirosina quinase ocorre à migração da proteína Grb10 para a membrana plasmática da célula, onde se liga à sítios fosforilados da subunidade β desses receptores (NANTEL et al., 1999). Quando o Grb10 se encontra em sua forma inativa, no citoplasma celular, ele está em sua forma oligomerizada, ou seja, formando tetrâmeros. Esses tetrâmeros são formados pela ligação das subunidades SH2 e PH de uma proteína a região N terminal de outra. O sinal que desencadeia a dissociação dos tetrâmeros em monômeros, forma ativa, é a ligação de fatores de crescimento aos receptores tirosina kinase e consequente ativação desses receptores (DONG et al., 1998).

2.3.1. Genes e Isoformas

Em humanos, o gene GRB10 está localizado no cromossoma 7 (DONG et al., 1997; LUCAS-FERNANDEZ et al., 2008), em camundongos no cromossoma 11 (OOI et al., 1995) e em bovinos no cromossoma 4 (RUDDOCK et al., 2004). O GRB10 é um gene *imprinted*,

isto é, possui expressão diferencial entre os alelos de origem materna e paterno, sendo muito expresso nos momentos iniciais do desenvolvimento embrionário e sofrendo regulação após o nascimento. A presença de RNAm para o Grb10 é descrita em embriões de camundongos com 13 dias de gestação e a proteína é observada no dia 14 de gestação (LUI et al., 2008). Trabalhos têm demonstrado que o Grb10 participa da regulação do crescimento embrionário e fetal, com isso, no momento do nascimento os animais com menor expressão do Grb10 possuem um maior desenvolvimento e conseqüentemente são maiores do que os animais com expressão normal desse fator (CHARALAMBOUS et al., 2003).

Em humanos, existem as isoformas hGrb10 γ , hGrb10 β , hGrb10 ζ e hGrb10 ϵ com pesos moleculares de 61kDa, 62kDa, 67kDa e 66kDa, respectivamente. Em camundongos existem as isoformas mGrb10 α e mGrb10 δ com pesos moleculares de 70kDa e 67kDa, respectivamente, diferindo portanto o peso molecular entre as espécies (OOI et al., 1995). A isoforma hGrb10 γ é a mais conservada se assemelhando as outras proteínas da família Grb7; enquanto, as outras isoformas humanas possuem a região N-Terminal estendida. Em camundongos, as isoformas mGrb10 α e mGrb10 δ possuem 80 e 55 aminoácidos, respectivamente, a mais inseridos entre os domínios P e RA, quando comparado ao hGrb10 γ (HOLT & SIDDLE, 2005). Apesar do conhecimento dessas diferentes isoformas, ainda não se sabe seu significado funcional.

2.3.2. Expressão do Grb10 em diferentes espécies animais

A expressão de RNAm, avaliada por Northern blot, para Grb10 em Murinos é alta em tecidos que possuem receptores de insulina como musculo esquelético, tecido adiposo, coração e rins, (OOI et al., 1995). Em embriões de camundongos, análise dos níveis de RNAm por hibridização *in situ* mostrou alta expressão de Grb10 em tecido muscular, fígado, cérebro e cartilagem (CHARALAMBOUS et al., 2003). Em ratos, estudo da expressão de RNAm, utilizando a técnica de RT-PCR, demonstrou que no fígado fetal o Grb10 é muito expresso, porém não foi detectado em fígados obtidos de animais adultos (GRUPPUSO et al., 2000).

A expressão de Grb10 em humanos nos diferentes tipos teciduais é similar à expressão em tecidos de murinos, com algumas exceções. Em humanos, o Grb10 possui alta expressão em músculo esquelético como em camundongos. Porém, diferentemente de camundongos, o

Grb10 também possui alta expressão em pâncreas humano (LIU & ROTH, 1995; O'NEILL et al., 1996; FRANTZ et al., 1997). A expressão dessa proteína é intermediária em músculo cardíaco e cérebro, enquanto baixa expressão é observada na placenta, pulmão, fígado, baço, próstata, testículos, ovário e no intestino. Embora não existam dados publicados sobre a expressão de Grb10 em tecido adiposo em humanos, em macaco Rhesus já foi detectado a expressão nesse tecido (O'NEILL et al., 1996).

Em bovinos, a expressão do GRB10 tem sido estudada pelo fato desse gene ser um gene *imprinting*, sendo importante na regulação do desenvolvimento embrionário inicial. Nesse sentido, trabalhos têm estudado a expressão desse gene durante o desenvolvimento embrionário para tentar entender e, com isso, prevenir as anormalidades de crescimento como, por exemplo, a síndrome do terneiro grande (“large offspring syndrome”) (TILGHMAN, 1999; TVEDEN-NYBORG et al., 2008). Por isso, esse gene é estudado em embriões bovinos em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário (RUDDOCK et al., 2004). Porém, ainda não existem dados publicados na literatura sobre a expressão de Grb10 em células foliculares de nenhuma espécie.

2.3.3. Regulação dos receptores de IGF-I pela proteína Grb10

A ativação dos receptores de IGF-I ocorre pela ligação do IGF-I à porção extracelular desses receptores, conhecida como subunidade α . A partir dessa ligação, ocorre ativação desse receptor tirosina quinase e subsequente fosforilação de resíduos de tirosina em sítios específicos da subunidade β , os quais se encontram na porção intracelular (STEELE-PERKINS et al., 1988). Com isso, ocorre a migração de substratos dos receptores de insulina (IRS) e do Shc (*Src homology collagen*) que se ligam aos sítios fosforilados dos receptores tirosina quinase. Esses mediadores intracelulares, IRS e Shc, ativam as rotas do PI3`-K (“*phosphatidylinositol 3-kinase*”) e da MAPK (“*Mitogen-activated protein kinase*”), respectivamente, e com isso vão desencadear mudanças intracelulares na expressão de genes relacionados com o controle do metabolismo e proliferação celular (YOUNGREN, 2007).

No momento da ativação dos receptores tirosina quinase, a proteína Grb10 se liga através das subunidades SH2 e BPS aos sítios fosforilados da porção β destes receptores (MORRIONE et al., 1996; WANG et al., 1999). Essa ligação resulta em um impedimento do acesso do IRS e do Shc aos sítios fosforilados dos receptores tirosina quinase. Com isso,

resultando no bloqueio da ativação das rotas intracelulares do PI3`-K e da MAPK (LIM et al., 2004).

Pesquisadores utilizaram uma linhagem celular responsiva ao IGF-I e que possuía uma expressão diminuída de Grb10, produzida pela técnica de RNA de interferência (siRNA), para estudar a ação do Grb10 sobre os receptores de IGF-I (DUFRESNE & SMITH, 2005). Nesse trabalho, observou-se um maior acesso dos IRS aos receptores de IGF-I ativados, maior fosforilação das proteínas Akt e das ERK1 e ERK2, proteínas essas chave para a ativação das rotas da PI3`-K e da MAPK, respectivamente. Além disso, confirmou-se uma maior proliferação das células que possuem uma expressão diminuída de Grb10 quando comparadas a células normais após estimulação com IGF-I, mostrando com isso, um efeito inibitório do Grb10 sobre os receptores de IGF-I.

Além de controlar a ação de fatores de crescimento, modulando rotas intracelulares ativadas pelos receptores de IGF-I, como citado acima, trabalhos utilizando uma linhagem celular de fibroblasto embrionário de camundongo, têm demonstrado que o Grb10 se associa com o Nedd4 (*“Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4”*) causando a ubiquitinação dos receptores de IGF-I (MORRIONE et al., 1999; ANDREA MORRIONE, 2003). A subunidade SH2 do Grb10 se associa a subunidade C2 do Nedd4, mediando a ligação do Nedd4 aos receptores de IGF-I (HUANG & SZEBENYI, 2010). A ubiquitinação de receptores promove a internalização e degradação desses receptores por enzimas lisossomais. Com isso, ocorre a diminuição da quantidade de receptores de IGF-I disponíveis na membrana da célula e conseqüentemente a diminuição da resposta das células ao IGF-I (VECCHIONE et al., 2003). Porém, outro trabalho utilizando camundongos knockout para o gene Nedd4, demonstrou que a diminuição da expressão proteica de Nedd4 resulta em um aumento da expressão proteica do Grb10 e também diminuição dos receptores de IGF-I presentes na membrana celular (CAO et al., 2008). Com isso, esse trabalho sugere que o Nedd4 controle a degradação da proteína Grb10 e desta forma estaria regulando positivamente a sinalização pelos receptores de IGF-I e, além disso, que o Grb10 atua na degradação dos receptores de IGF-I. Porém, mais trabalhos devem ser realizados para um melhor entendimento da interação do Nedd4 com o Grb10 e, além disso, nenhum desses trabalhos avaliou os parâmetros reprodutivos dos animais utilizados para os experimentos.

3- CAPÍTULO 1

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

**EXPRESSION, REGULATION AND PROSPECTIVE FUNCTION
OF GRB10 DURING FOLLICLE DEVIATION IN CATTLE**

**Rodrigo Camponogara Bohrer, Paulo Roberto Antunes da Rosa, Olmiro
Andrade Neto, Rogério Ferreira, Gabriel Pereira, Vilceu Bordignon, João
Francisco Coelho de Oliveira, Paulo Bayard Dias Gonçalves**

ENDOCRINOLOGY, 2011

1 **Expression, regulation and prospective function of Grb10 during follicle deviation in cattle**

2 **Rodrigo Camponogara Bohrer¹, Paulo Roberto Antunes da Rosa¹, Olmiro Andrade Neto¹,**
3 **Rogério Ferreira¹, Gabriel Ribas Pereira¹, Vilceu Bordignon², João Francisco Coelho de**
4 **Oliveira¹, Paulo Bayard Dias Gonçalves¹**

5 ¹ Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa
6 Maria, RS, Brazil;

7 ² Department of Animal Science, McGill University, Ste-Anne-de-Bellevue, Québec, Canada.

8

9 Running Title: Grb10 on follicular deviation.

10 Key Words: bovine, ovary, granulosa cells, theca cells, follicular development.

11

12 Corresponding author and reprint requests:

13 **Paulo Bayard Dias Gonçalves**

14 **e-mail:** bayard@biorep.ufsm.br

15 **Address:** Universidade Federal de Santa Maria,
16 Avenida Roraima, nº 1000, Prédio 97, sala 416.

17 Postal code 97105-900

18 Santa Maria, RS, Brazil

19 **Tel:** +55 (55) 32208484

20 **Fax:** +55 (55) 32208484

21

22 Rodrigo Bohrer was supported by CAPES and CNPq, Brazil.

23 Disclosure statement: The authors of this manuscript have nothing to declare.

24

25 **Abstract**

26 The growth factor receptor-bound protein 10 (Grb10) has been extensively studied in human
27 and has been implicated in the regulation of MAPK and PI3K pathways, activated by Insulin-like
28 Growth Factor Receptor (IGF-IR). In cattle, it is well established that the IGF system is required for
29 follicular dominance. On the other hand, Grb10 protein has not been studied in follicular
30 development, dominance or deviation of any species. Then, we conducted experiments to characterize
31 the Grb10 in ovarian follicular cells and to evaluate the regulation of Grb10 mRNA expression during
32 follicular deviation. Cow ovaries were obtained from an abattoir, transported to the laboratory on ice
33 and processed immediately. Granulosa and theca cells collected from follicles of 3-5 mm, 6-8 mm and
34 > 8 mm of diameter expressed Grb10 mRNA and protein. Western blot assay from granulosa cells
35 lysates showed a single band while three bands were observed in theca cells. The confocal study
36 demonstrated presence of Grb10 in the cytoplasm of theca and granulosa cells. After characterize the
37 Grb10 message and protein in follicular cells, we studied the regulation of Grb10 in follicular cells
38 during deviation in vivo. Higher Grb10 mRNA expression was observed in subordinate follicles when
39 compared to the dominant follicle ($P < 0.05$) as well as a negative correlation between Grb10 and
40 aromatase throughout the follicular deviation ($P < 0.05$). To our knowledge, this is the first report of
41 Grb10 expression in granulosa and theca cells during follicular development. Moreover, the results
42 present strong evidence that Grb10 mRNA expression is regulated during follicle deviation and,
43 therefore, is potentially involved in the selection of dominant follicle in cattle.

44 **Introduction**

45 In mammals, growth factors play key roles in regulating ovarian follicular dominance and
46 deviation (1-5) and depend on activation of tyrosine kinase receptor (RTK) (6). The insulin-like
47 growth factor-I (IGF-I) is well established as one of the key regulators of the follicular growth wave
48 in cattle through RTKs (4, 7). When IGF-I binds and activates the RTK, the insulin receptor substrates
49 (IRS-1 and IRS-2) and Src homology collagen (Shc) migrate to bind the phosphorylated RTK in the
50 β -subunit. These intracellular mediators, IRS and Shc, activate the phosphatidylinositol 3-kinase
51 (PI3K) and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways, respectively, to trigger changes
52 in expression of genes related to the control of cellular metabolism, proliferation and differentiation

53 (8). In antral follicle, the IGF-I stimulates granulosa and theca cells proliferation and steroidogenesis
54 and inhibits apoptosis modulating the selection of dominant follicle and regulation of follicular
55 deviation (9).

56 The Growth Factor Receptor-bound Protein 10 (Grb10) belongs to Grb7 family of proteins
57 and is widely studied in humans, where it act negatively regulating the tyrosine kinase receptor
58 signaling (10). The Grb10 protein binds to phosphorylated sites of the β -subunit of the IGF-I receptor
59 to prevent the access of IRS and Shc and, consequently, inhibiting the activation of intracellular PI3K
60 and MAPK pathways. Therefore, Grb10 modulate negatively the cellular metabolism and
61 proliferation (11-13). These studies confirm the great importance of the Grb10 protein modulating
62 intracellular signaling pathways activated by IGF-I receptor (IGF-IR).

63 To our knowledge, the Grb10 protein has not been studied in follicular cells of any animal
64 species. In view that the IGF-I is important for dominant follicle selection during follicle deviation in
65 cattle and that Grb10 negatively regulates the activation of intracellular pathways activated by IGF-IR
66 in another species studied, our hypothesis is that the Grb10 is expressed in follicular cells and can act
67 to regulate the IGF-IR signaling that participates on follicular selection during bovine follicle
68 deviation. Therefore, the aim of this study was to provide a better understanding of the follicular
69 dominance and deviation with particular focus on expression and regulation of Grb10 in follicular
70 cells during the period of follicle deviation in cows.

71

72 **Materials and Methods**

73 *Granulosa and theca cells from ovaries collected from abattoir*

74 Bovine ovaries were obtained at a local abattoir and transported to the laboratory at 4°C.
75 Twelve follicles of three different diameters were dissected from these ovaries to represent different
76 stages of follicular wave: before deviation (3-5 mm), during deviation (6-8 mm) and after follicular
77 deviation (> 8 mm). Subsequently, the granulosa and theca cells were dissected as described before

78 (5) for extraction of RNA and protein. Bovine fetal liver and human liver samples (size about 2 mm³)
79 were used as positive control of Grb10 gene expression (14).

80

81 *Synchronization of ovarian follicular wave to obtain granulosa and theca cells*

82 All experimental procedures were reviewed and approved by the Animal Ethics Committee of
83 Federal University of Santa Maria, RS, Brazil (number 36/2010). In this study, cycling, non-lactating,
84 mature Hereford cows, with a body condition score of 3 or 4 (scale from 1-thin to 5-obese) were used.
85 Cows were injected intramuscularly 0.530 mg of cloprostenol (Ciosin - Schering-Plough Animal
86 Health) to induce luteolysis and observed for estrus twice daily for five days. Following, animals
87 showing estrus were evaluated once a day by transrectal ultrasonography using an 8 MHz linear-array
88 transducer (Aquila Vet scanner, Pie Medical, Netherlands). All follicles larger than 5 mm were
89 drafted using 3 to 5 virtual slices of the ovary allowing their three-dimensional localization. Each
90 individual follicle was monitored during follicular wave. The day of the follicular emergence was
91 designated as Day 0 of the wave and was retrospectively identified as the last day on which the
92 dominant follicle had 4 or 5 mm in diameter (15). Cows were randomly assigned to be ovariectomized
93 by colpotomy on days 2, 3 or 4 of the follicular wave (4 cows for each day) to recover the largest and
94 second largest follicle from each cow and granulosa and theca cells were harvested as reported earlier
95 (5). Based on data of follicular diameter and aromatase (CYP19A1) expression, the follicles from
96 days 2, 3 and 4 were considered to be before, during and after follicle deviation, respectively (15).

97

98 *Nucleic acid extraction and real-time RT-PCR*

99 Total RNA was extracted using Trizol (theca cells; Invitrogen, Carlsbad, CA) or silica based
100 protocol (granulosa cells; Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions and was
101 quantified by absorbance at 260 nm using a spectrophotometer NanoDrop (Thermo Fischer Scientific
102 Inc., Waltham, MA). Total RNA (1 mg) was treated with 0.2U DNase (Invitrogen) at 37°C for 5 min
103 to digest any contaminating DNA, followed by heating to 65°C for 3 min. The RNA was reverse
104 transcribed (RT) in the presence of 1µM oligo (dT) primer, 4U Omniscript RTase (Omniscript RT

105 Kit; Qiagen), 0.5 μ M dideoxynucleotide triphosphate (dNTP) mix, and 10U RNase inhibitor
106 (Invitrogen) in a volume of 20 μ l at 37°C for 1 h. The reaction was terminated by incubation at 93°C
107 for 5 min.

108 The relative gene expression was assessed by real-time RT-PCR (RT-PCR) using the
109 StepOnePlus™ RT-PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA). All samples were analyzed
110 in duplicate and each sample contained 12.5 μ l of SYBR Green PCR Master Mix (Applied
111 Biosystems), 8.5 μ l of H₂O, 1 μ l of forward primer (200 nM), 1 μ l of reverse primer (200 nM) and 2 μ l
112 of cDNA. The primers were designed in Primer Express program v 3.3 (Applied Biosystems) from
113 gene sequences obtained from Genbank or obtained from literature (Table 1). All primers used in this
114 work were synthesized by Invitrogen. The reaction was carried out as following: 50°C for 2 min, 95°C
115 for 10 min, 40 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. Melting-curve analyses were performed
116 to verify product identity. The variability in the amount of mRNA was corrected by amplification of
117 cyclophilin housekeeping gene, and relative expression was calculated as recommended by Pfaffl
118 (16).

119 Cross-contamination of theca and granulosa cells samples was tested by PCR detection of the
120 mRNAs that encode cytochrome P450 aromatase (CYP19A1) and 17 α -hydroxylase (CYP17A1)
121 (Table 1). Granulosa cells samples that expressed CYP17A1 and theca cells samples that expressed
122 CYP19A1 were discarded (17).

123

124 *Western Blot analysis*

125 Cell samples were frozen at -80°C in protein extraction buffer (106.6 mM NaCl, 9.9 mM Tris-
126 HCl, 12.72 mM EDTA) for 20 min and subsequently lysed using the same buffer supplemented with
127 1 mM PMSF and 1% Nonidet NP-40. The cell lysates were clarified by centrifugation and protein
128 concentration determined using the Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific) following the
129 manufacturer's recommendations.

130 Western blot was carried out using 30 µg of protein per sample. Samples were run on 12.5%
131 polyacrylamide gel for total proteins separation, transferred to nitrocellulose membrane and
132 incubated overnight in blocking solution (0,05% PBS tween with 0,5% non-fat milk). Following, the
133 membrane was incubated in blocking solution with antibodies to detect specific proteins. We used a
134 rabbit polyclonal primary antibody against specific C-terminal region of the Grb10 protein (dilution
135 1:300; Santa Cruz Biotechnology; sc-1026) and a goat secondary antibody against rabbit proteins and
136 conjugated with horseradish peroxidase (dilution 1:2500; Santa Cruz Biotechnology; sc-2004) to
137 study the Grb10 protein expression in different cells types. Through chemiluminescent reaction, using
138 the Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific), and X-Ray film
139 revelation (Kodak) were obtained bands representing Grb10 protein expression in different cell types.

140

141 *Immunofluorescence assessment*

142 Cows Ovaries were collected at a local abattoir and transported to laboratory at 4°C, fixed in
143 4% paraformaldehyde for 24 h and paraffin embedded. Histological sections with 5 µm in thickness
144 were cut and slides prepared for immunofluorescence analysis. Slides were deparaffinized using
145 Xylene for 15 min, rehydrated through a graded alcohol series (one times for five min in each 100%,
146 90%, 80%, 70% and 50% dilution), and rinsed for 15 min in ddH₂O. Endogenous peroxidase activity
147 was then blocked for 20 min in 0.3% H₂O₂ and rinsed three times in PBS1X for 5 min. Following the
148 slides were carefully blotted using a PAP pen (Vector Laboratory, Burlingame, CA) around the tissue.
149 A blocking solution (PBS1X with 3% of Bovine Serum Albumin and 0.2% Tween-20) was used to
150 block non-specific sites during 2 h at room temperature in a humidify chamber. After rinsed three
151 times in PBS1X during 5 min, blocking solution was used to incubate the primary Grb10 antibody
152 (dilution 1:100; Santa Cruz Biotechnology; sc-1026) in a humidified chamber overnight at 5⁰C. In this
153 step, the negative control was incubated in blocking solution without primary antibody. After this
154 incubation, samples were rinsed three times in a PBS1X containing 0.2% Tween-20 for 5 min before
155 being incubated for 1 h at room temperature with goat anti-rabbit IgG antibody conjugated with
156 AlexaFluor 488 (dilution 1:500; Invitrogen; A-11008). Then, slides were rinsed in three times in a

157 PBS1X containing 0.2% Tween-20 for 5 min. Finally, to enable nuclear staining visualization,
158 samples were incubated with 300 nM of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Invitrogen) in PBS1X
159 for 5 min at room temperature. Slides were mounted with a space between the coverslip, filled with 50
160 μ l drop of Aqueous Mounting Medium (Fluoromount; Sigma) and sealed with nail polish. Laser-
161 scanning confocal microscopy was performed using a Confocal Microscope Espectral FV1000
162 (Olympus), equipped with two lasers for the simultaneous excitation of fluorescein for Grb10
163 detection in follicular cells, and DAPI for DNA, in fluorescence excitation and emission of 495/518
164 and 358/461 nm, respectively. Image software FV-Viewer (Olympus) was used to analyze samples
165 images.

166

167 *Statistical analysis*

168 The differences on continuous data between dominant and subordinate follicle was assessed
169 by paired Student's T test using the cow as subject. Data were tested for normal distribution using
170 Shapiro-Wilk test and normalized when necessary. The correlation between aromatase and Grb10
171 expression was made by simple linear regression analysis. All analyses were performed using JMP
172 software (SAS Institute Inc., Cary, NC) and a $P < 0.05$ was considered statistically significant. Data
173 are presented as mean \pm sem.

174

175 **Results**

176 *Expression of Grb10 mRNA and protein in granulosa and theca cells from follicles at different stages*
177 *of development.*

178 The expression of Grb10 has not been studied in ovarian follicular cells. In this experiment,
179 the mRNA and protein expression of Grb10 was assessed, respectively, by RT-PCR and Western blot
180 in theca and granulosa cells of 3-5 mm, 6-8 mm and > 8 mm diameter follicles from abattoir ovaries.
181 The mRNA (data not shown) and protein (Fig. 1A) expression of Grb10 was observed in theca and
182 granulosa cells from all follicles diameter in the three replications. Fetal bovine and human liver was

183 used as positive control (Fig. 1 B). In all follicular stages, it was observed only one band from
184 granulosa cells with molecular weight between 95kDa and 130kDa by the Western blot analysis.
185 However, in the theca cells, three different bands were observed with molecular weights between
186 56kDa and 130kDa (Fig. 1A). Three protein bands with molecular weights near of 56kDa and
187 between 72kDa and 170kDa were also observed in positive control samples of human and bovine fetal
188 liver, respectively (Fig. 1B). Interestingly, each type of tissue exhibited different bands for Grb10
189 protein.

190

191 *Localization of Grb10 protein in follicular cells.*

192 Immunofluorescence confocal microscopy of ovarian tissue revealed the presence of Grb10
193 protein in granulosa, theca and stroma cells (Fig. 2C). In the negative control samples, cells were not
194 stained in the absence of primary antibody (Fig. 2A). The immunofluorescence reaction denoted the
195 localization of Grb10 in the cytoplasm of granulosa and theca cells. (Fig. 2D). The granulosa and
196 theca cell nuclei were intensely marked with DAPI but not with Grb10 antibody (Fig. 2B).

197

198 *Expression of Grb10 mRNA in granulosa and theca cells between subordinate and dominant follicles* 199 *during follicular deviation.*

200 Once Grb10 was present in theca and granulosa cells, we performed an experiment using an
201 in vivo model to study its expression before, during and after follicular deviation. In addition, the
202 expression of Grb10 was correlated with aromatase mRNA expression. The expression of Grb10 was
203 greater after deviation (at day 4 of the follicular wave) in theca and granulosa cells of subordinated
204 follicles than dominant follicles. The concentration of estradiol in follicular fluid of dominant follicles
205 was significantly greater compared with subordinated follicle during and after deviation (data not
206 shown). In addition, the expression of Grb10 had a negative correlation with the aromatase expression
207 in granulosa cells during follicular deviation (Fig. 4).

208

209 Discussion

210 The main findings of this study are the following: 1) to our knowledge, this is the first report
211 of Grb10 expression in ovarian follicular cells; 2) the Western blot assay from granulosa cells showed
212 one band while three bands was observed from theca cells; 3) The Grb10 protein was present on the
213 cytoplasm of follicular cells; 4) Grb10 mRNA was more expressed in subordinate follicles than in
214 dominant follicles after follicle deviation; 5) the expression of Grb10 was negatively correlated with
215 aromatase mRNA expression in granulosa cells. These results provide the first evidence that Grb10 is
216 involved in the regulatory pathway to control follicle deviation.

217 The follicular cells (theca and granulosa) expressed Grb10 in follicle size of 3-5, 6-8 and >8
218 mm of diameter. These sizes correspond to previously characterized as being before, during and after
219 follicular deviation (15). In these period, the IGF system (consisting of IGF-I and IGF-II, receptor
220 type I and II, family of binding proteins (IGFBPs) and IGFBP proteases) is one of the most studied
221 and well established system that participate in the selection of dominant follicle (18-20). Furthermore,
222 studies in cattle have showed that the activation of MAPK and PI3K intracellular pathways targeted
223 by IGF-IR are important to promote dominant follicle selection during the follicular wave (21, 22).
224 However, there have been no reports about intracellular signaling regulation of IGF-IR by Grb10
225 protein in the follicular cells. Using NIH-3T3 cells (mouse embryo fibroblast cell line), works have
226 shown in other cell type that the Grb10 acts negatively regulating the activation of intracellular
227 pathways activated by IGF-I, which are the MAPK and PI3K, responsible to induce cell proliferation,
228 differentiation and apoptosis prevention (11, 12). Taken together, our results and those previously
229 reported suggest a possible participation of Grb10 on follicular selection by inhibiting the MAPK and
230 PI3K pathways activated by IGF-IR.

231 The Western blot analysis revealed one band from granulosa cells (between 95 and 130kDa)
232 and three bands from theca cells (56 and 130 kDa), human liver (near 56kDa) and bovine fetal liver
233 (between 72kDa and 170kDa; Fig. 1). The presence of these proteins with different molecular
234 weights can be explained by the presence of different isoforms of this protein. In human cell lines,
235 four different isoforms of Grb10 protein were observed (23). In mice cell lines, was reported the

236 presence of two isoforms of this protein with different molecular weights, and these isoforms are
237 different of human isoforms (14). Although different isoforms of Grb10 protein have been shown,
238 their functional importance is not known yet. Another possible explanation for the presence of Grb10
239 proteins with different molecular weights is the dimer or even tetramer formations in the cell
240 cytoplasm, as demonstrated previously using Chinese hamster cell lines (24).

241 In the confocal microscopy images, the Grb10 protein was verified in the cytoplasm of
242 follicular cells (Fig. 2). In human and mouse cell lines, active form of Grb10 is located in the cell
243 plasma membrane linked to the receptor-type tyrosine kinase, while the inactive form of Grb10 is
244 present in the cytoplasm of the cell (25, 26). In the same studies, it was showed that the inactive form
245 changed to active form of Grb10 when IGF-I bound to the receptor (IGF-IR). This active form is able
246 to promote the regulation of MAPK and PI3K intracellular signaling pathways.

247 *In vivo*, a higher expression of Grb10 was observed in granulosa and theca cells from
248 subordinate follicles than dominant follicles at day 4 of follicular wave (short after follicle deviation;
249 $P < 0.05$). Furthermore, a trend of increasing Grb10 expression in the subordinated follicle was noted
250 at days 2 and 3 of follicular wave, (Fig. 3A-B). These results present evidence to suggest that Grb10
251 induce a negative regulation on intracellular signaling pathways activated by IGF-IR. Similar to what
252 occurs in human and mice cells, Grb10 is probably inhibiting the activation of MAPK and PI3K
253 pathways in follicular cells (11, 12) and with that participating of follicle deviation (15, 22). Although
254 it is well established that Grb10 regulates negatively the MAPK and PI3K intracellular signaling the
255 Grb10 binds to ubiquitin Nedd4 (Neuronal precursor cell the expressed developmentally down-
256 regulated 4), which complex binds to IGF-IR to increase ubiquitination, to make faster internalization,
257 and to enhance degradation of this receptor (28-30).

258 Finally, we also observed a negative correlation between Grb10 and aromatase mRNA
259 expression using an *in vivo* model (Fig. 4). It is well accepted that IGF-I induce an increase in the
260 aromatase expression and estradiol production in bovine granulosa cells (31-33). Therefore, these
261 finds are a further evidence that Grb10 is negatively regulating the intracellular signaling of IGF-IR.

262 In conclusion, we demonstrated here for the first time that Grb10 is expressed in follicular cells and
263 plays a role in the regulatory pathway of follicle deviation in cows.

264

265 **Acknowledgments**

266 The authors would like to thank Dr. Eduardo Furtado Flores of the Federal University of
267 Santa Maria, Virology Laboratory, for help in the western blot analyses. The human liver samples
268 were kindly provided by Dr. Cláudio Sityá. We also thank the Center of Electronic Microscopy of the
269 Federal University of Rio Grande do Sul for the confocal microscopy analysis and the Silva abattoir
270 that provided the bovine ovaries. This study was supported by Brazilian Council of Scientific and
271 Technological Development (CNPq) and the Coordination for Improvement of Higher Education
272 Personnel (CAPES).

273

274 **References**

- 275 1. **Simpson RB, Chase CC, Spicer LJ, Vernon RK, Hammond AC, Rae DO** 1994 Effect of
276 exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth
277 factor binding protein activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in
278 superovulated Angus and Brahman cows. *J Reprod Fertil* 102:483-492
- 279 2. **Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R** 2000 Expression and
280 localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during
281 the final growth of bovine ovarian follicles. *J Endocrinol* 167:371-382
- 282 3. **Gall L, Chene N, Dahirel M, Ruffini S, Boulesteix C** 2004 Expression of epidermal growth
283 factor receptor in the goat cumulus-oocyte complex. *Molecular Reproduction and*
284 *Development* 67:439-445

- 285 4. **Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Meira C, Kot K** 2004 In Vivo Effects of an Intrafollicular
286 Injection of Insulin-Like Growth Factor 1 on the Mechanism of Follicle Deviation in Heifers
287 and Mares. *Biology of Reproduction* 70:99-105
- 288 5. **Buratini J, Pinto MGL, Castilho AC, Amorim RL, Giometti IC, Portela VM, Nicola ES, Price CA**
289 2007 Expression and Function of Fibroblast Growth Factor 10 and Its Receptor, Fibroblast
290 Growth Factor Receptor 2B, in Bovine Follicles. *Biology of Reproduction* 77:743-750
- 291 6. **Schlessinger J** 2000 Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 103:211-225
- 292 7. **Rivera GM, Fortune JE** 2003 Proteolysis of Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins -4 and
293 -5 in Bovine Follicular Fluid: Implications for Ovarian Follicular Selection and Dominance.
294 *Endocrinology* 144:2977-2987
- 295 8. **LEROITH D, WERNER H, BEITNER-JOHNSON D, ROBERTS AT, JR** 1995 Molecular and Cellular
296 Aspects of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor. *Endocr Rev* 16:143-163
- 297 9. **Webb R, Campbell BK** 2007 Development of the dominant follicle: mechanisms of selection
298 and maintenance of oocyte quality. *Soc Reprod Fertil Suppl* 64:141-163
- 299 10. **Daly RJ** 1998 The Grb7 Family of Signalling Proteins. *Cellular Signalling* 10:613-618
- 300 11. **Dufresne AM, Smith RJ** 2005 The Adapter Protein GRB10 Is an Endogenous Negative
301 Regulator of Insulin-Like Growth Factor Signaling. *Endocrinology* 146:4399-4409
- 302 12. **Morrione A, Valentinis B, Resnicoff M, Xu S-q, Baserga R** 1997 The Role of mGrb10alpha in
303 Insulin-like Growth Factor I-mediated Growth. *J Biol Chem* 272:26382-26387
- 304 13. **Lucas-Fernandez E, Garcia-Palmero I, Villalobo A** 2008 Genomic organization and control of
305 the grb7 gene family. *Curr Genomics* 9:60-68
- 306 14. **Holt LJ, Siddle K** 2005 Grb10 and Grb14: Enigmatic regulators of insulin action - And more?
307 *Biochemical Journal* 388:393-406
- 308 15. **Evans ACO, Fortune JE** 1997 Selection of the Dominant Follicle in Cattle Occurs in the
309 Absence of Differences in the Expression of Messenger Ribonucleic Acid for Gonadotropin
310 Receptors. *Endocrinology* 138:2963-2971

- 311 16. **Pfaffl MW** 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.
312 Nucleic Acids Res 29:e45
- 313 17. **Buratini J, Jr, Teixeira AB, Costa IB, Glapinski VF, Pinto MGL, Giometti IC, Barros CM, Cao**
314 **M, Nicola ES, Price CA** 2005 Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of
315 cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles.
316 Reproduction 130:343-350
- 317 18. **Spicer LJ, Echterkamp SE** 1995 The ovarian insulin and insulin-like growth factor system
318 with an emphasis on domestic animals. Domestic Animal Endocrinology 12:223-245
- 319 19. **Fortune JE, Rivera GM, Yang MY** 2004 Follicular development: the role of the follicular
320 microenvironment in selection of the dominant follicle. Animal Reproduction Science 82-
321 83:109-126
- 322 20. **Sudo N, Shimizu T, Kawashima C, Kaneko E, Tetsuka M, Miyamoto A** 2007 Insulin-like
323 growth factor-I (IGF-I) system during follicle development in the bovine ovary: Relationship
324 among IGF-I, type 1 IGF receptor (IGFR-1) and pregnancy-associated plasma protein-A
325 (PAPP-A). Molecular and Cellular Endocrinology 264:197-203
- 326 21. **Evans ACO, Martin F** 2000 Kinase pathways in dominant and subordinate ovarian follicles
327 during the first wave of follicular development in sheep. Animal Reproduction Science
328 64:221-231
- 329 22. **Ryan KE, Casey SM, Canty MJ, Crowe MA, Martin F, Evans ACO** 2007 Akt and Erk signal
330 transduction pathways are early markers of differentiation in dominant and subordinate
331 ovarian follicles in cattle. Reproduction 133:617-626
- 332 23. **Dong LQ, Du H, Porter SG, Kolakowski Jr. LF, Lee AV, Mandarino J, Fan J, Yee D, Liu F** 1997
333 Cloning, Chromosome Localization, Expression, and Characterization of an Src Homology
334 2 and Pleckstrin Homology Domain-containing Insulin Receptor Binding Protein
335 hGrb10gamma. J Biol Chem 272:29104-29112

- 336 24. **Dong LQ, Porter S, Hu D, Liu F** 1998 Inhibition of hGrb10 Binding to the Insulin Receptor by
337 Functional Domain-mediated Oligomerization. *J Biol Chem* 273:17720-17725
- 338 25. **Nantel A, Huber M, Thomas DY** 1999 Localization of Endogenous Grb10 to the Mitochondria
339 and Its Interaction with the Mitochondrial-associated Raf-1 Pool. *Journal of Biological*
340 *Chemistry* 274:35719-35724
- 341 26. **Frantz JD, Giorgetti-Peraldi S, Ottinger EA, Shoelson SE** 1997 Human GRB-IRbeta /GRB10.
342 SPLICE VARIANTS OF AN INSULIN AND GROWTH FACTOR RECEPTOR-BINDING PROTEIN WITH
343 PH AND SH2 DOMAINS. *J Biol Chem* 272:2659-2667
- 344 27. **Morrione A, Plant P, Valentinis B, Staub O, Kumar S, Rotin D, Baserga R** 1999 mGrb10
345 Interacts with Nedd4. *Journal of Biological Chemistry* 274:24094-24099
- 346 28. **Andrea Morrione** 2003 Grb10 adapter protein as regulator of insulin-like growth factor
347 receptor signaling. *Journal of Cellular Physiology* 197:307-311
- 348 29. **Monami G, Emiliozzi V, Morrione A** 2008 Grb10/Nedd4-mediated multiubiquitination of the
349 insulin-like growth factor receptor regulates receptor internalization. *Journal of Cellular*
350 *Physiology* 216:426-437
- 351 30. **Vecchione A, Marchese A, Henry P, Rotin D, Morrione A** 2003 The Grb10/Nedd4 Complex
352 Regulates Ligand-Induced Ubiquitination and Stability of the Insulin-Like Growth Factor I
353 Receptor. *Mol Cell Biol* 23:3363-3372
- 354 31. **Mani AM, Fenwick MA, Cheng Z, Sharma MK, Singh D, Wathes DC** IGF1 induces up-
355 regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of
356 phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells. *Reproduction*
357 139:139-151
- 358 32. **Gutiérrez CG, Campbell BK, Webb R** 1997 Development of a long-term bovine granulosa cell
359 culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-
360 stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biology of Reproduction* 56:608-
361 616

- 362 33. **Spicer LJ, Chamberlain CS, Maciel SM** 2002 Influence of gonadotropins on insulin- and
363 insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells.
364 Domestic Animal Endocrinology 22:237-254
- 365 34. **Luo W, Wiltbank MC** 2006 Distinct Regulation by Steroids of Messenger RNAs for FSHR and
366 CYP19A1 in Bovine Granulosa Cells. Biol Reprod 75:217-225

367

368

369

TABLE 1. Primers used in the expression analysis. Cyclophilin was used as the housekeeping gene.

Target	Sequence	Fragment Size (bp)	Reference accession n°	or
Grb10	F 5'-CACTCTGGTCGCCTACACAA-3'	125	NM_001192586.1	
	R 5'-TACAAGAAGGCAGTGCAACG-3'			
Cyclophilin	F 5'-GGTCATCGGTCTCTTTGGAA-3'	117	NM_174152.2	
	R 5'-TCCTTGATCACACGATGGAA-3'			
CYP19A1	F 5'-GTGTCCGAAGTTGTGCCTATT-3'	148	(34)	
	R 5'-GGAACCTGCAGTGGGAAATGA-3'			
CYP17A1	F 5'-GAATGCCTTTGCCCTGTTCA-3'	330	(17)	
	R 5'-CGCGTTTGAACACAACCCTT-3'			

F = forward primer; R = reverse primer.

Figures and Legends

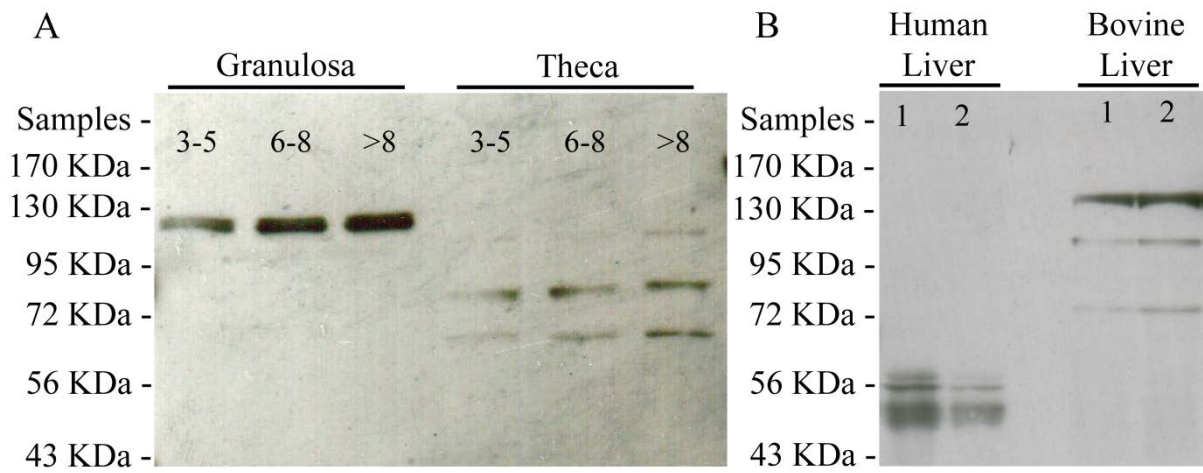


FIG. 1. Grb10 protein expression in different follicular cell types by western blot. A – Samples 3-5, 6-8 and > 8 of granulosa and theca cells were collected of bovine follicles from abattoir and represent, respectively, follicle cells before deviation (3-5 mm in diameter), during deviation (6-8 mm in diameter) and after deviation (>8 mm in diameter). B – 1 and 2 represent different samples of human or bovine liver, used as positive control.

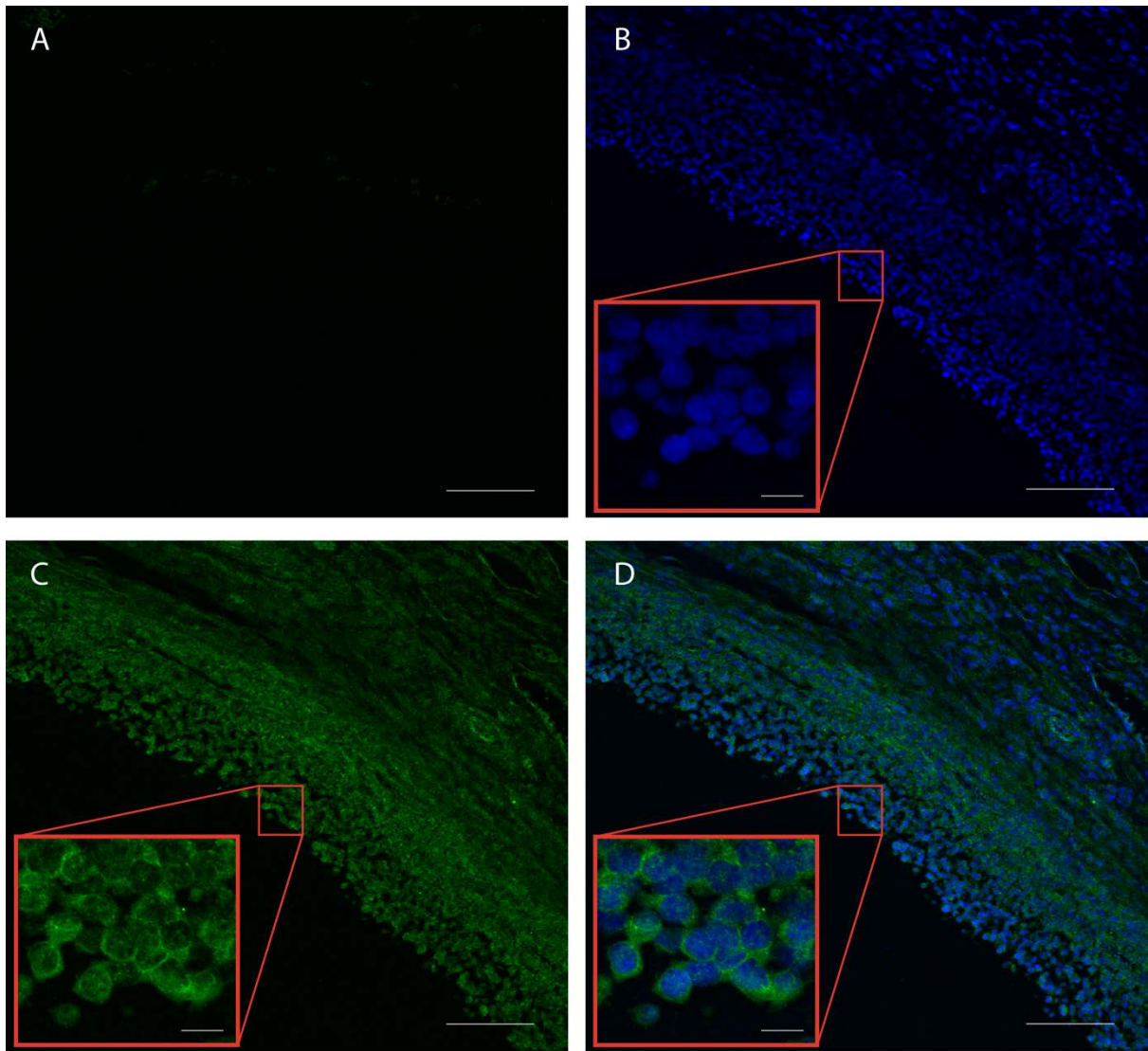


FIG. 2. Confocal microscopy images of bovine follicles. (A) Negative control. (B) Follicular cells nuclei marked with DAPI (blue color). (C) Grb10 protein on the follicular cells stained with secondary antibody Alexa 488 (green color). (D) Merged images showing Grb10 protein on the cytoplasm (green) and nuclei stained in blue by DAPI. Scale bar, 100 μm in the main figures and 10 μm in the insets (Small square 60x and large square 20x).

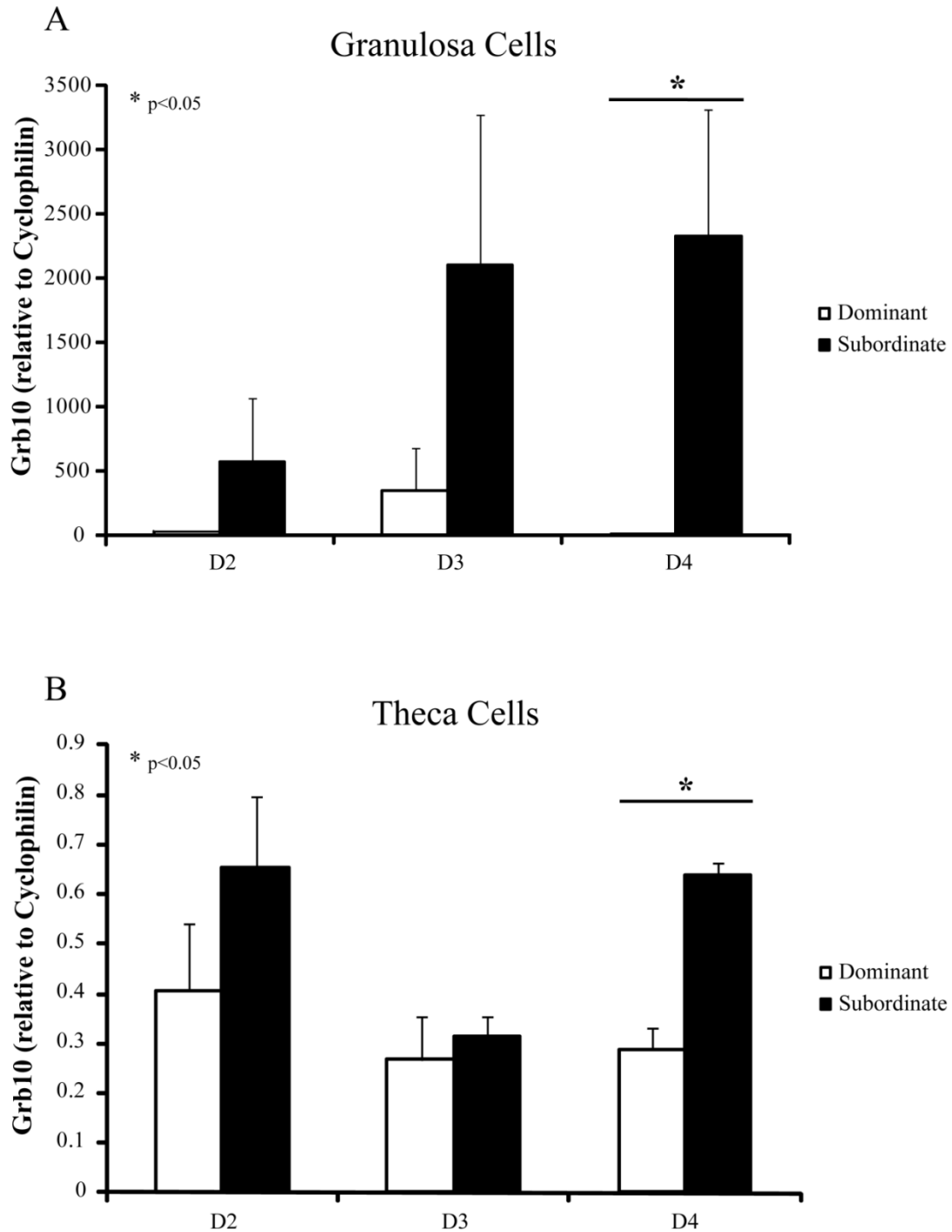


FIG. 3. Expression of Grb10 mRNA in granulosa (A) and theca (B) cells of follicles at different days of the follicular deviation stages *in vivo* (D2 – before deviation, D3 – during deviation, D4 – after deviation). White bars represent cells from dominant follicles and black bars represent cells from subordinate follicles. Asterisk indicates statistic difference between dominant and subordinate follicle in the same day (* $P < 0.05$).

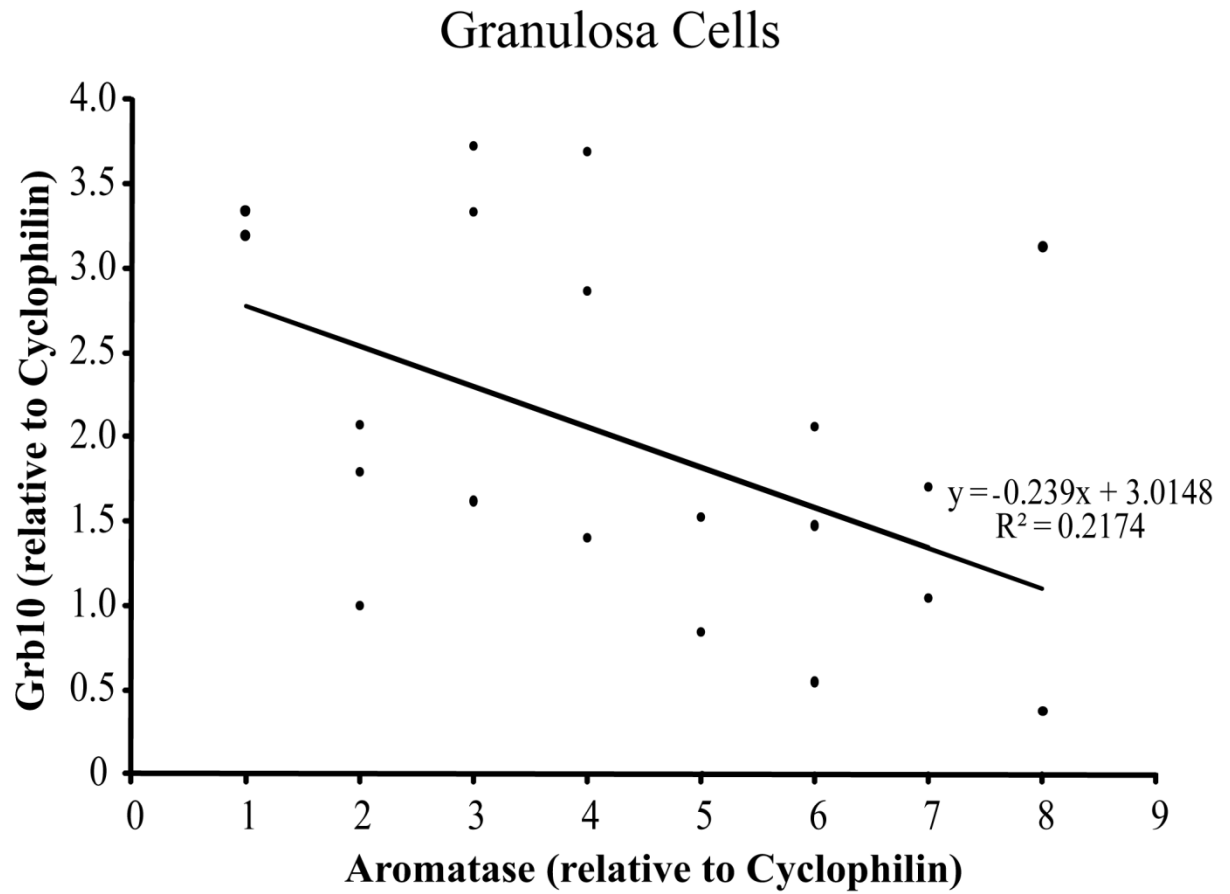


FIG. 4. Correlation between Grb10 mRNA and aromatase mRNA expressions in granulosa cells from bovine follicles obtained *in vivo* during days 2, 3 and 4 of the follicular wave ($P=0,0287$).

4- CONCLUSÃO

Utilizando a espécie bovina como modelo experimental, demonstramos que o Grb10 é expresso em células foliculares durante o desenvolvimento folicular, que a proteína Grb10 se encontra principalmente no citoplasma das células foliculares, que o Grb10 é menos expresso em folículos dominantes quando comparados aos folículos subordinados durante a divergência folicular e, além disso, existe uma correlação negativa entre a expressão de Grb10 e aromatase durante a divergência folicular nas células da granulosa. Com esses resultados podemos concluir que o Grb10 é expresso em células foliculares possuindo expressão diferencial entre folículos subordinados e dominantes e está correlacionado negativamente com a expressão de aromatase durante a divergência folicular em bovinos. Com base nos resultados obtidos neste trabalho e nos dados de literatura, sugerimos que o Grb10 possa estar regulando negativamente as rotas intracelulares da MAPK e da PI3`-K, ativadas pelos receptores de IGF-I e, desta forma, participa da seleção do folículo dominante durante a divergência folicular em bovinos. Este é o primeiro trabalho na literatura a estudar o Grb10 em células foliculares durante o desenvolvimento folicular. Desta forma, mais estudos serão conduzidos para o melhor entendimento da ação do Grb10 na fisiologia reprodutiva de fêmeas bovinas. Com isso, almejamos que futuramente o conhecimento gerado neste trabalho possa ser utilizado para ajudar a solucionar problemas reprodutivos que acometem as fêmeas.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G. P., et al. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **J Reprod Fertil**, v.94, n.1, p.177-188. 1992.

ADASHI, E. Y., et al. A NOVEL ROLE FOR SOMATOMEDIN-C IN THE CYTODIFFERENTIATION OF THE OVARIAN GRANULOSA CELL. **Endocrinology**, v.115, n.3, p.1227-1229. 1984.

ANDREA MORRIONE. Grb10 adapter protein as regulator of insulin-like growth factor receptor signaling. **Journal of Cellular Physiology**, v.197, n.3, p.307-311. 2003.

ARMSTRONG, D. G., et al. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein -2 and -4 Messenger Ribonucleic Acid Expression in Bovine Ovarian Follicles: Effect of Gonadotropins and Developmental Status. **Endocrinology**, v.139, n.4, p.2146-2154. 1998.

BAO, B., et al. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v.56, n.5, p.1158-1168. 1997.

BEG, M. A., et al. Follicular-Fluid Factors and Granulosa-Cell Gene Expression Associated with Follicle Deviation in Cattle. **Biology of Reproduction**, v.64, n.2, p.432-441. 2001.

CAO, X. R., et al. Nedd4 Controls Animal Growth by Regulating IGF-1 Signaling. **Sci. Signal.**, v.1, n.38, p.ra5-. 2008.

CHARALAMBOUS, M., et al. Disruption of the imprinted Grb10 gene leads to disproportionate overgrowth by an Igf2-independent mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.14, p.8292-8297. 2003.

D'ERCOLE, A. J., et al. Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus. **Developmental Biology**, v.75, n.2, p.315-328. 1980.

D'MELLO, S. R., et al. Insulin-Like Growth Factor and Potassium Depolarization Maintain Neuronal Survival by Distinct Pathways: Possible Involvement of PI 3-Kinase in IGF-1 Signaling. **The Journal of Neuroscience**, v.17, n.5, p.1548-1560. 1997.

DALY, R. J. The Grb7 Family of Signalling Proteins. **Cellular Signalling**, v.10, n.9, p.613-618. 1998.

DI PAOLA, R., et al. Association of hGrb10 Genetic Variations With Type 2 Diabetes in Caucasian Subjects. **Diabetes Care**, v.29, n.5, p.1181-1183. 2006.

DONG, L. Q., et al. Cloning, Chromosome Localization, Expression, and Characterization of an Src Homology 2 and Pleckstrin Homology Domain-containing Insulin Receptor Binding Protein hGrb10gamma. **J. Biol. Chem.**, v.272, n.46, p.29104-29112. 1997.

DONG, L. Q., et al. Inhibition of hGrb10 Binding to the Insulin Receptor by Functional Domain-mediated Oligomerization. **J. Biol. Chem.**, v.273, n.28, p.17720-17725. 1998.

DUFRESNE, A. M.; R. J. SMITH. The Adapter Protein GRB10 Is an Endogenous Negative Regulator of Insulin-Like Growth Factor Signaling. **Endocrinology**, v.146, n.10, p.4399-4409. 2005.

EVANS, A. C. O.; J. E. FORTUNE. Selection of the Dominant Follicle in Cattle Occurs in the Absence of Differences in the Expression of Messenger Ribonucleic Acid for Gonadotropin Receptors. **Endocrinology**, v.138, n.7, p.2963-2971. 1997.

EVANS, A. C. O.; F. MARTIN. Kinase pathways in dominant and subordinate ovarian follicles during the first wave of follicular development in sheep. **Animal Reproduction Science**, v.64, n.3-4, p.221-231. 2000.

FERREIRA, R., et al. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**, v.134, n.5, p.713-719. 2007.

FRANTZ, J. D., et al. Human GRB-IRbeta /GRB10. SPLICE VARIANTS OF AN INSULIN AND GROWTH FACTOR RECEPTOR-BINDING PROTEIN WITH PH AND SH2 DOMAINS. **J. Biol. Chem.**, v.272, n.5, p.2659-2667. 1997.

GIBBONS, J. R., et al. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biology of Reproduction**, v.57, n.5, p.1066-1073. 1997.

GINTHER, O., et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol Reprod**, v.55, n.6, p.1187-1194. 1996.

GINTHER, O. J., et al. In Vivo Effects of an Intrafollicular Injection of Insulin-Like Growth Factor 1 on the Mechanism of Follicle Deviation in Heifers and Mares. **Biology of Reproduction**, v.70, n.1, p.99-105. 2004.

GINTHER, O. J., et al. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of fsh concentrations. **Theriogenology**, v.52, n.6, p.1079-1093. 1999.

GINTHER, O. J., et al. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **J Reprod Fertil**, v.87, n.1, p.223-230. 1989.

GIOVANNONE, B., et al. Two Novel Proteins That Are Linked to Insulin-like Growth Factor (IGF-I) Receptors by the Grb10 Adapter and Modulate IGF-I Signaling. **J. Biol. Chem.**, v.278, n.34, p.31564-31573. 2003.

GRUPPUSO, P. A., et al. Identification of candidate growth-regulating genes that are overexpressed in late gestation fetal liver in the rat. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v.1494, n.3, p.242-247. 2000.

GUTIÉRREZ, C. G., et al. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. **Biology of Reproduction**, v.56, n.3, p.608-616. 1997.

HANSEN, H., et al. Interaction between the Grb10 SH2 Domain and the Insulin Receptor Carboxyl Terminus. **J. Biol. Chem.**, v.271, n.15, p.8882-8886. 1996.

HE, W., et al. Grb10 Interacts Differentially with the Insulin Receptor, Insulin-like Growth Factor I Receptor, and Epidermal Growth Factor Receptor via the Grb10 Src Homology 2 (SH2) Domain and a Second Novel Domain Located between the Pleckstrin Homology and SH2 Domains. **J. Biol. Chem.**, v.273, n.12, p.6860-6867. 1998.

HODGKINSON, S. C., et al. Distribution of Circulating Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) into Tissues. **Endocrinology**, v.129, n.4, p.2085-2093. 1991.

HOLT, L. J.; K. SIDDLE. Grb10 and Grb14: Enigmatic regulators of insulin action - And more? **Biochemical Journal**, v.388, n.2, p.393-406. 2005.

HU, C.-L., et al. Cell Cycle Progression and Activation of Akt Kinase Are Required for Insulin-Like Growth Factor I-Mediated Suppression of Apoptosis in Granulosa Cells. **Mol Endocrinol**, v.18, n.2, p.326-338. 2004.

HUANG, Q.; D. M. E. SZEBENYI. Structural Basis for the Interaction between the Growth Factor-binding Protein GRB10 and the E3 Ubiquitin Ligase NEDD4. **Journal of Biological Chemistry**, v.285, n.53, p.42130-42139. 2010.

KLAPPER, D. G., et al. SEQUENCE ANALYSIS OF SOMATOMEDIN-C: CONFIRMATION OF IDENTITY WITH INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I. **Endocrinology**, v.112, n.6, p.2215-2217. 1983.

LE ROITH, D., et al. The Somatomedin Hypothesis: 2001. **Endocr Rev**, v.22, n.1, p.53-74. 2001.

LEMMON, M. A.; K. M. FERGUSON. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. **Biochem. J.**, v.350, n.1, p.1-18. 2000.

LEROITH, D., et al. Molecular and Cellular Aspects of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor. **Endocr Rev**, v.16, n.2, p.143-163. 1995.

LIM, M. A., et al. Grb10: more than a simple adaptor protein. **Front Biosci**, v.9, p.387-403. 2004.

LIU, F.; R. A. ROTH. Grb-IR: a SH2-domain-containing protein that binds to the insulin receptor and inhibits its function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, n.22, p.10287-10291. 1995.

LUCAS-FERNANDEZ, E., et al. Genomic organization and control of the grb7 gene family. **Curr Genomics**, v.9, n.1, p.60-8. 2008.

LUI, J. C., et al. An imprinted gene network that controls mammalian somatic growth is down-regulated during postnatal growth deceleration in multiple organs. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.295, n.1, p.R189-196. 2008.

MAZERBOURG, S., et al. Pregnancy-Associated Plasma Protein-A (PAPP-A) in Ovine, Bovine, Porcine, and Equine Ovarian Follicles: Involvement in IGF Binding Protein-4 Proteolytic Degradation and mRNA Expression During Follicular Development. **Endocrinology**, v.142, n.12, p.5243-5253. 2001.

MCCANN, J. A., et al. Evidence against GRB10 as the Gene Responsible for Silver-Russell Syndrome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.286, n.5, p.943-948. 2001.

MIHM, M., et al. Decline in serum follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in selection of the dominant follicle in heifers. **Biology of Reproduction**, v.57, n.6, p.1328-1337. 1997.

MONGET, P., et al. Localization, characterization, and quantification of insulin-like growth factor-I-binding sites in the ewe ovary. **Endocrinology**, v.125, n.5, p.2486-93. 1989.

MORRIONE, A., et al. mGrb10 Interacts with Nedd4. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.34, p.24094-24099. 1999.

MORRIONE, A., et al. Grb10: A New Substrate of the Insulin-like Growth Factor I Receptor. **Cancer Research**, v.56, n.14, p.3165-3167. 1996.

NANTEL, A., et al. Localization of Endogenous Grb10 to the Mitochondria and Its Interaction with the Mitochondrial-associated Raf-1 Pool. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.50, p.35719-35724. 1999.

O'NEILL, T. J., et al. Interaction of a GRB-IR Splice Variant (a Human GRB10 Homolog) with the Insulin and Insulin-like Growth Factor I Receptors. EVIDENCE FOR A ROLE IN MITOGENIC SIGNALING. **J. Biol. Chem.**, v.271, n.37, p.22506-22513. 1996.

OOI, J., et al. The cloning of Grb10 reveals a new family of SH2 domain proteins. **Oncogene**, v.10, n.8, p.1621-30. 1995.

PERKS, C., et al. Localization of messenger ribonucleic acids for insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, and the type 1 IGF receptor in the ovine ovary throughout the estrous cycle. **Endocrinology**, v.136, n.12, p.5266-5273. 1995.

RINDERKNECHT, E.; R. E. HUMBEL. Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.73, n.7, p.2365-9. 1976.

RINDERKNECHT, E.; R. E. HUMBEL. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. **Journal of Biological Chemistry**, v.253, n.8, p.2769-2776. 1978.

RIVERA, G. M., et al. A Potential Role for Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-4 Proteolysis in the Establishment of Ovarian Follicular Dominance in Cattle. **Biology of Reproduction**, v.65, n.1, p.102-111. 2001.

RIVERA, G. M.; J. E. FORTUNE. Development of Codominant Follicles in Cattle Is Associated with a Follicle-Stimulating Hormone-Dependent Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-4 Protease. **Biol Reprod**, v.65, n.1, p.112-118. 2001.

RIVERA, G. M.; J. E. FORTUNE. Proteolysis of Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins -4 and -5 in Bovine Follicular Fluid: Implications for Ovarian Follicular Selection and Dominance. **Endocrinology**, v.144, n.7, p.2977-2987. 2003.

RODRIGUEZ-VICIANA, P., et al. Signaling Specificity by Ras Family GTPases Is Determined by the Full Spectrum of Effectors They Regulate. **Mol. Cell. Biol.**, v.24, n.11, p.4943-4954. 2004.

RUDDOCK, N. T., et al. Analysis of Imprinted Messenger RNA Expression During Bovine Preimplantation Development. **Biol Reprod**, v.70, n.4, p.1131-1135. 2004.

RYAN, K. E., et al. Akt and Erk signal transduction pathways are early markers of differentiation in dominant and subordinate ovarian follicles in cattle. **Reproduction**, v.133, n.3, p.617-626. 2007.

SANTIAGO, C. A., et al. Pregnancy-associated plasma protein-A and insulin-like growth factor binding protein mRNAs in granulosa cells of dominant and subordinate follicles of preovulatory cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.28, n.1, p.46-63. 2005.

SASAKI, N., et al. Characterization of insulin-like growth factor I-stimulated tyrosine kinase activity associated with the beta-subunit of type I insulin-like growth factor receptors of rat liver cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.260, n.17, p.9793-9804. 1985.

SASAOKA, T., et al. Evidence for a functional role of Shc proteins in mitogenic signaling induced by insulin, insulin-like growth factor-1, and epidermal growth factor. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.18, p.13689-13694. 1994.

SAVION, N., et al. Factors Controlling Proliferation and Progesterone Production by Bovine Granulosa Cells in Serum-Free Medium. **Endocrinology**, v.109, n.2, p.409-420. 1981.

SCHAMS, D., et al. Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. **Domestic Animal Endocrinology**, v.22, n.1, p.51-72. 2002.

SIROIS, J.; J. E. FORTUNE. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v.39, n.2, p.308-317. 1988.

SPICER, L. J., et al. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. **J. Anim Sci.**, v.71, n.5, p.1232-1241. 1993.

SPICER, L. J.; S. E. ECHTERNKAMP. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.12, n.3, p.223-245. 1995.

STEELE-PERKINS, G., et al. Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v.263, n.23, p.11486-11492. 1988.

STEIN, E. G., et al. The BPS domain of Grb10 inhibits the catalytic activity of the insulin and IGF1 receptors. **FEBS Letters**, v.493, n.2-3, p.106-111. 2001.

SUDO, N., et al. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) system during follicle development in the bovine ovary: Relationship among IGF-I, type 1 IGF receptor (IGFR-1) and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A). **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.264, n.1-2, p.197-203. 2007.

TARTARE-DECKERT, S., et al. Evidence for a Differential Interaction of SHC and the Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) with the Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) Receptor in the Yeast Two-hybrid System. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.40, p.23456-23460. 1995.

TILGHMAN, S. M. The Sins of the Fathers and Mothers: Genomic Imprinting in Mammalian Development. **Cell**, v.96, n.2, p.185-193. 1999.

TVEDEN-NYBORG, P. Y., et al. Analysis of the expression of putatively imprinted genes in bovine peri-implantation embryos. **Theriogenology**, v.70, n.7, p.1119-1128. 2008.

VECCHIONE, A., et al. The Grb10/Nedd4 Complex Regulates Ligand-Induced Ubiquitination and Stability of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor. **Mol. Cell. Biol.**, v.23, n.9, p.3363-3372. 2003.

WANDJI, S. A., et al. Ontogeny and cellular localization of 125I-labeled insulin-like growth factor-I, 125I-labeled follicle-stimulating hormone, and 125I-labeled human chorionic gonadotropin binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biology of Reproduction**, v.47, n.5, p.814-822. 1992.

WANG, J., et al. Grb10, a Positive, Stimulatory Signaling Adapter in Platelet-Derived Growth Factor BB-, Insulin-Like Growth Factor I-, and Insulin-Mediated Mitogenesis. **Mol. Cell. Biol.**, v.19, n.9, p.6217-6228. 1999.

XU, Z., et al. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, v.53, n.4, p.951-957. 1995.

YOUNGREN, J. Regulation of insulin receptor function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.64, n.7, p.873-891. 2007.