



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA - BACHARELADO

**DINÂMICA DA LOCALIZAÇÃO E FOSFORILAÇÃO DA PLK1 (THR210 E
SER137) DURANTE A MATURAÇÃO MEIÓTICA DE OÓCITOS MURINOS**

HAI DI GIULIANA LEON USCAPI

Foz do Iguaçu
2025



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA - BACHARELADO

**DINÂMICA DA LOCALIZAÇÃO E FOSFORILAÇÃO DA PLK1 (THR210 E
SER137) DURANTE A MATURAÇÃO MEIÓTICA DE OÓCITOS MURINOS**

HAI DI GIULIANA LEON USCAPI

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dr. Carla Vermeulen
Carvalho Grade
Coorientador: Prof. Dr. Weber Beringui Feitosa

Foz do Iguaçu
2025

HAI DI GIULIANA LEON USCAPI

**DINÂMICA DA LOCALIZAÇÃO E FOSFORILAÇÃO DA PLK1 (THR210 E SER137)
DURANTE A MATURAÇÃO MEIÓTICA DE OÓCITOS MURINOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto Latino-
Americano de Ciências da Vida e da
Natureza da Universidade Federal da
Integração Latino- Americana, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Carla Vermeulen Carvalho Grade
UNILA

Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana
UNILA

Prof. Dr. Jean Franciesco Vettorazzi
UNILA

Foz do Iguaçu, 07 de agosto de 2025

Dedico este trabalho à minha mãe, minha maior inspiração, força e exemplo de determinação. Foi ela quem me brindou com a oportunidade de aprender, de sonhar e de seguir em frente, mesmo diante dos desafios.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela luz em meus passos, pela força nas fraquezas e por guiar meu coração em cada etapa desta jornada.

À minha mãe, que com coragem e ternura me ensinou a arte da perseverança, e que, mesmo nas tempestades, me mostrou que sempre há um caminho a seguir.

À minha família, por cada gesto de amor, por cada palavra de alento, por ser abrigo nos dias difíceis e celebração nas conquistas.

À minha orientadora, Profa. Carla Vermeulen Carvalho Grade, pela paciência, sabedoria e confiança que me acompanharam nesta etapa tão importante da minha formação.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Weber Beringui Feitosa, pela orientação precisa, pela paciência generosa e pelo valioso conhecimento transmitido ao longo deste trabalho, essencial para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Ao Prof. Kelvinson Fernandes Viana e ao Prof. Jean Francisco Vettorazi, pela paciência e pelo conhecimento compartilhado, que foram de grande valor ao longo deste processo de aprendizado.

À Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), pela oportunidade de conviver com pessoas de diferentes países e culturas, por oferecer um ambiente rico, experiências únicas e um aprendizado que vai além do acadêmico — que também é humano, cultural e transformador. Agradeço pelos recursos, pelas oportunidades e pelos encontros que fizeram toda a diferença.

Aos amigos que a UNILA me proporcionou, por tornarem esse caminho mais leve, pelas memórias compartilhadas, pelas risadas, pelas histórias e pela amizade sincera e constante.

RESUMO

A proteína quinase polo-like kinase 1 (PLK1) desempenha papel essencial na regulação da progressão meiótica, participando de processos como a montagem e manutenção do fuso meiótico, o posicionamento dos centros organizadores de microtúbulos (MTOCs) e a ligação correta entre cinetócoros e microtúbulos. A hipótese deste estudo foi de que a PLK1 apresenta padrões subcelulares de localização e fosforilação distintamente regulados durante a maturação de oócitos murinos, com funções complementares associadas à fosforilação nos resíduos Thr210 e Ser137. Foram utilizados 15 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6J (6–10 semanas de idade), cujos oócitos no estágio de vesícula germinativa (GV) foram coletados após estimulação hormonal e submetidos à maturação *in vitro*. As análises de imunofluorescência foram realizadas nos estágios GV (0 h), GVBD (4 h), metáfase I (8 h), anáfase/telófase I (10 h) e metáfase II (12 h), avaliando-se a localização subcelular da PLK1 total, PLK1 fosforilada em Thr210 e PLK1 fosforilada em Ser137. A PLK1 total apresentou marcação predominantemente nuclear em GV, com redistribuição para os polos do fuso e região centromérica a partir de GVBD, presença na zona intermediária do fuso durante a telófase e retorno aos polos e centrômeros em MII. A PLK1 fosforilada em Thr210 exibiu padrão semelhante ao da PLK1 total, mas, a partir de GVBD, também foi detectada ao longo da região do fuso meiótico, sugerindo participação direta na montagem e estabilização dos microtúbulos. A PLK1 fosforilada em Ser137 seguiu o padrão da PLK1 total, restrita a polos e centrômeros durante a maior parte da meiose, com presença adicional na região do fuso apenas em MII, possivelmente relacionada à manutenção do fuso bipolar já estabelecido. Os achados indicam que a fosforilação da PLK1 em Thr210 e Ser137 é diferencialmente regulada durante a maturação oocitária, refletindo funções complementares na montagem, manutenção e reorganização do fuso meiótico, bem como no controle da ligação cinetócoro–microtúbulo, processos essenciais para a segregação cromossômica fiel.

Palavras-chave: maturação oocitária, PLK1, fosforilação, fuso meiótico, cinase.

RESUMEN

La proteína quinasa Polo-like kinase 1 (PLK1) desempeña un papel central en la regulación de la progresión meiótica, participando en procesos como el ensamblaje y mantenimiento del huso meiótico, la organización de los centros organizadores de microtúbulos (MTOCs) y la unión correcta entre cinetocoros y microtúbulos. La hipótesis de este estudio fue que la PLK1 presenta patrones subcelulares de localización y fosforilación regulados de forma distinta durante la maduración de ovocitos murinos, con funciones complementarias asociadas a la fosforilación en los residuos Thr210 y Ser137. Se utilizaron 15 ratonas hembras de la cepa C57BL/6J (de 6 a 10 semanas de edad), cuyos ovocitos en estadio de vesícula germinal (GV) fueron recolectados tras estimulación hormonal y sometidos a maduración *in vitro*. Los análisis de inmunofluorescencia se realizaron en los estadios GV (0 h), GVBD (4 h), metafase I (8 h), anafase/telofase I (10 h) y metafase II (12 h), evaluándose la localización subcelular de PLK1 total, PLK1 fosforilada en Thr210 y PLK1 fosforilada en Ser137. La PLK1 total presentó marcación predominantemente nuclear en GV, con redistribución hacia los polos del huso y la región centromérica a partir de GVBD, presencia en la zona media durante la telofase y retorno a los polos y centrómeros en MII. La PLK1 fosforilada en Thr210 exhibió un patrón similar al de la PLK1 total, pero a partir de GVBD también fue detectada a lo largo del huso meiótico, lo que sugiere una participación directa en el ensamblaje y estabilización de los microtúbulos. La PLK1 fosforilada en Ser137 siguió el patrón de PLK1 total, restringida a polos y centrómeros durante la mayor parte de la meiosis, con presencia adicional en la región del huso solo en MII, posiblemente relacionada con el mantenimiento del huso bipolar ya establecido. Los hallazgos indican que la fosforilación de la PLK1 en Thr210 y Ser137 está regulada de forma diferencial durante la maduración ovocitaria, reflejando funciones complementarias en el ensamblaje, mantenimiento y reorganización del huso meiótico, así como en el control de la unión cinetocoro–microtúbulo, procesos esenciales para una segregación cromosómica precisa.

Palabras clave: maduración ovocitaria, PLK1, fosforilación, huso meiótico, quinasa.

ABSTRACT

The Polo-like kinase 1 (PLK1) protein plays a central role in regulating meiotic progression, participating in processes such as the assembly and maintenance of the meiotic spindle, the positioning of microtubule organizing centers (MTOCs), and the proper attachment between kinetochores and microtubules. The hypothesis of this study was that PLK1 displays distinctly regulated subcellular patterns of localization and phosphorylation during mouse oocyte maturation, with complementary functions associated with phosphorylation at Thr210 and Ser137 residues. Fifteen female mice of the C57BL/6J strain (6–10 weeks old) were used. Germinal vesicle (GV) stage oocytes were collected after hormonal stimulation and subjected to *in vitro* maturation. Immunofluorescence analyses were performed at the GV (0 h), GVBD (4 h), metaphase I (8 h), anaphase/telophase I (10 h), and metaphase II (12 h) stages, evaluating the subcellular localization of total PLK1, PLK1 phosphorylated at Thr210, and PLK1 phosphorylated at Ser137. Total PLK1 showed predominantly nuclear labeling at the GV stage, with redistribution to spindle poles and the centromeric region from GVBD onward, presence in the midzone during telophase, and return to the poles and centromeres at MII. PLK1 phosphorylated at Thr210 exhibited a pattern similar to total PLK1 but, from GVBD onward, was also detected along the meiotic spindle region, suggesting a direct role in microtubule assembly and stabilization. PLK1 phosphorylated at Ser137 followed the pattern of total PLK1, being restricted to poles and centromeres during most of meiosis, with additional presence in the spindle region only at MII, possibly related to the maintenance of the already established bipolar spindle. These findings indicate that PLK1 phosphorylation at Thr210 and Ser137 is differentially regulated during oocyte maturation, reflecting complementary roles in the assembly, maintenance, and reorganization of the meiotic spindle, as well as in the regulation of kinetochore–microtubule attachment—processes essential for accurate chromosome segregation.

Key words: oocyte maturation, PLK1, phosphorylation, meiotic spindle, kinase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Padrão da localização subcelular da PLK1 durante a maturação <i>in vitro</i> ...	24
Figura 2 – Distribuição subcelular da PLK1 fosforilada em Thr210 durante a maturação meiótica de oócitos de camundongos	26
Figura 3 – Dinâmica subcelular da PLK1 fosforilada em Ser137 durante a maturação <i>in vitro</i> de oócitos de camundongos.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Cdk1	Quinase dependente de ciclina 1 (<i>Cyclin-dependent kinase 1</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>DeoxyriboNucleic acid</i>)
eCG	Gonadotrofina coriônica equina (<i>Equine Chorionic Gonadotropin</i>)
FSH	Hormônio folículo estimulante (<i>Follicle-Stimulating Hormone</i>)
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas (<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>)
GV	Vesícula germinativa (<i>Germinal vesicle</i>)
GVBD	Quebra da vesícula germinativa (<i>Germinal Vesicle BreakDown</i>)
hCG	Gonadotrofina coriônica humanaequina (<i>Human Chorionic Gonadotropin</i>)
LH	Hormônio luteinizante (<i>Luteinizing Hormone</i>)
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos (<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>)
MTOC	Centro organizador de microtúbulos (<i>Microtubule-Organizing Center</i>)
PBD	Domínio Polo-box (<i>Polo-Box domain</i>)
PLK1	Quinase Ssmelhante à Polo 1 (<i>Polo-like kinase 1</i>)
PMSG	Gonadotrofina sérica de égua prenhe (<i>Pregnant Mare Serum Gonadotrophin</i>)
SAC	Ponto de controle do fuso (<i>Spindle Assembly Checkpoint</i>)
Ser137	Serina 137
Thr210	Treonina 210

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO	16
2.1. OOGÊNESE	16
2.2. MATURAÇÃO DE OÓCITOS EM MAMÍFEROS	16
2.2.1. Controle Hormonal da Maturação Oocitária	17
2.3. PAPEL DAS PROTEÍNAS QUINASES NA MEIOSE	18
2.4. ESTRUTURA E FUNÇÃO DA POLO-LIKE KINASE	19
2.5. FUNÇÕES DA PLK1 NA MEIOSE DE OÓCITOS	20
3. JUSTIFICATIVA	21
4. HIPÓTESE	22
5. OBJETIVOS	23
5.3. OBJETIVO GERAL	23
5.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
6. MATERIAL E MÉTODOS	23
6.1. DECLARAÇÃO ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	23
6.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	24
6.3. COLETA E MATURAÇÃO DE OÓCITOS	24
6.4. IMUNOFLUORESCÊNCIA	25
6.5. ANTICORPOS	25
7. RESULTADOS	26
7.1. DINÂMICA DA PLK1 TOTAL EM RELAÇÃO À A-TUBULINA DURANTE A MATURAÇÃO MEIÓTICA DOS OÓCITOS MURINOS	26
7.2. DINÂMICA DA PLK1 FOSFORILADA NO RESÍDUO THR210 DURANTE A MATURAÇÃO MEIÓTICA DOS OÓCITOS MURINOS	28
7.3. DINÂMICA DA PLK1 FOSFORILADA NO RESÍDUO SER137 DURANTE A MATURAÇÃO MEIÓTICA DOS OÓCITOS MURINOS	29
7.4. INTEGRAÇÃO DOS RESULTADOS	31
8. DISCUSSÃO	32
9. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

A reprodução em mamíferos é um processo biológico fundamental para a manutenção e diversidade genética das espécies. Nesse contexto, a maturação do gameta feminino (oócito) desempenha um papel crucial no sucesso da fecundação e no desenvolvimento embrionário. Sua importância reside no fato de que, para garantir a continuidade da espécie, é necessário preservar a variabilidade e integridade genética, promovida pela meiose e pela fecundação. Esses dois processos fundamentais compreendem, respectivamente, a redução do número de cromossomos de diploide para haploide e a fusão de duas células haploides, restaurando o número diploide no indivíduo (HASSOLD; HUNT, 2001).

Assim, a maturação do oócito envolve uma série de eventos celulares e moleculares que garantem o correto curso da meiose e a geração de gametas femininos com a capacidade para suportar a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial. (COTICCHIO et al., 2015).

Para compreender o processo de maturação oocitária, é fundamental distinguir os dois principais tipos de divisão celular: a mitose e a meiose. A mitose ocorre em células somáticas diploides e está envolvida na formação, crescimento e regeneração de tecidos e órgãos. Nesse processo, uma célula-mãe dá origem a duas células-filhas geneticamente idênticas, preservando o número de cromossomos (BATTY; GERLICH, 2019). Por outro lado, a meiose é característica das células germinativas, como oócitos e espermatozoides, e envolve duas divisões celulares consecutivas após uma única replicação do DNA. Como resultado, são geradas células haploides, com metade do número cromossômico da célula original, o que contribui para a variabilidade genética (OHKURA, 2015).

Tanto a mitose quanto a meiose seguem etapas bem definidas, denominadas fases da divisão celular. A prófase é caracterizada pela condensação dos cromossomos e início da formação do fuso mitótico. Na prometáfase, ocorre a desintegração do envelope nuclear e os microtúbulos do fuso ligam-se aos cinetócoros dos cromossomos. Durante a metáfase, os cromossomos alinham-se no plano equatorial da célula. Na anáfase, as cromátides-irmãs (na mitose) ou os cromossomos homólogos (na meiose I) são separadas e puxadas para os polos opostos da célula. A telófase marca o reestabelecimento das membranas nucleares em torno dos conjuntos cromossômicos segregados. Por fim, ocorre a citocinese, que

promove a divisão física do citoplasma e resulta na formação de duas células-filhas (BERGERO et al., 2021).

Durante a maturação oocitária, o oócito retoma a meiose I. Esse processo se inicia ainda na vida fetal e é interrompido ao redor do nascimento, no estágio de prófase I (fase de vesícula germinativa). A partir da puberdade, com a estimulação hormonal, o oócito completa a meiose I, culminando na extrusão do primeiro corpúsculo polar. Em seguida, inicia a meiose II, sendo ovulado e permanecendo bloqueado em metáfase II até que ocorra a fecundação. A duplicação do DNA ocorre previamente à meiose I, durante a fase S do ciclo celular, não havendo uma nova replicação genômica entre as duas divisões meióticas. Entre os eventos-chave da maturação estão a quebra da vesícula germinativa (GVBD), a montagem do fuso meiótico e a correta orientação dos cromossomos. A transição entre os estágios meióticos depende da formação de um fuso bipolar funcional e da interação apropriada entre cinetócoros e microtúbulos. Falhas nesses mecanismos podem comprometer a segregação cromossômica, resultando em aneuploidias (alterações numéricas nos cromossomos), que representam uma das principais causas de infertilidade feminina e de falhas em tratamentos de reprodução assistida (QIAN et al., 2017; SHOMPER, LICHLYTER E SCHINDLER, 2014; LAMB et al., 2005).

Durante a divisão celular eucariótica, a segregação cromossômica adequada depende da correta orientação dos cinetócoros, que devem se conectar à microtúbulos provenientes de polos opostos do fuso mitótico (processo denominado biorientação). Essa configuração garante que, durante a anáfase, os cromossomos homólogos (na meiose I) ou as cromátides-irmãs (na meiose II) sejam tracionados para polos opostos da célula (CHMÁTAL et al., 2015). A regulação desses eventos meióticos é coordenada por uma complexa rede de sinalização celular, envolvendo diversas proteínas quinases. Entre elas, a Polo-like kinase 1 (PLK1) destaca-se por seu papel essencial no controle de múltiplas etapas da divisão celular. A PLK1 é uma quinase serina/treonina constituída por um domínio catalítico N-terminal, responsável por sua atividade enzimática, e um domínio regulador C-terminal, denominado *Domínio Polo-box* (PBD). Este domínio medeia a ligação a proteínas previamente fosforiladas, modulando tanto a localização subcelular quanto a função da enzima (TAKAOKA et al., 2014).

Em células somáticas, a PLK1 desempenha um papel central na dinâmica do fuso mitótico, atuando desde a prometáfase até a conclusão da divisão celular. Durante a prometáfase, a PLK1 contribui para estabilizar as ligações entre os cinetócoros e os microtúbulos, garantindo o correto ancoramento e alinhamento cromossômico. Na metáfase, mantém a estabilidade dessas conexões, assegurando a biorientação adequada. Além disso, está envolvida em diversos processos-chave do ciclo mitótico, incluindo a entrada em mitose, a maturação dos centrossomos, a montagem e o alongamento do fuso mitótico, o controle da segregação cromossômica e a citocinese — etapa final da divisão celular, em que ocorre a separação física das células-filhas (TONG et al., 2002; GHEGHIANI et al., 2017).

A atividade da PLK1 é finamente regulada por fosforilação, um processo no qual grupos fosfato são adicionados a resíduos específicos da proteína, promovendo mudanças conformacionais que ativam sua função enzimática. Um dos resíduos críticos para essa ativação é a treonina 210 (Thr210), localizada na região conhecida como T-loop (Alça de ativação T). A fosforilação desse resíduo é essencial para a atividade catalítica da PLK1 e para sua função adequada durante a divisão celular (JANG et al., 2002). Concomitantemente com a fosforilação da Thr210, ocorre a fosforilação da serina 137 (Ser137). Contudo, a fosforilação da Ser137 possui um papel regulatório independente de Thr210, localizando-se especificamente nos polos do fuso e entre os braços cromossômicos, essencial para a montagem do fuso meiótico e segregação cromossômica adequada (CHAPAGAI et al., 2025).

Apesar do amplo conhecimento sobre o papel da PLK1 em células somáticas, ainda não está completamente elucidado se essa quinase desempenha funções equivalentes durante a meiose em oócitos, especialmente no que diz respeito à regulação espacial e temporal de sua localização, às formas fosforiladas e aos mecanismos que modulam sua ativação por fosforilação (TONG et al., 2002).

Uma característica singular dos oócitos é a ausência de centríolos e, conseqüentemente, de centrossomos (estruturas que, em células somáticas, organizam os microtúbulos e são essenciais para a formação do fuso mitótico). Nos oócitos, em substituição aos centrossomos, existem múltiplos centros organizadores de microtúbulos (MTOCs) acentriolares distribuídos pelo citoplasma, os quais se auto-organizam para formar um fuso bipolar acentriolar (VAN VUGT et al., 2004; SCHUH E ELLENBERG, 2007). Em células somáticas, por outro lado, a PLK1 apresenta

localização marcante nos centrossomos (GOLSTEYN et al., 1995), sugerindo que sua dinâmica de distribuição e função pode diferir substancialmente entre os dois contextos celulares.

Essa diferença estrutural levanta a hipótese de que, nos oócitos, a PLK1 possa desempenhar funções adaptadas ao contexto acentriolar, regulando a nucleação, organização e estabilidade dos microtúbulos a partir dos MTOCs. Estudos em modelos murinos mostram que a PLK1 se localiza transitoriamente nos polos do fuso meiótico e, em alguns casos, ao longo dos microtúbulos, sugerindo envolvimento na montagem e manutenção do fuso bipolar acentriolar (WIANNY et al., 1998; ALFARO et al., 2021). Além disso, a fosforilação em resíduos específicos, como Thr210 e Ser137, tem sido associada à ativação funcional da PLK1 nesse contexto, influenciando a progressão meiótica e a correta segregação cromossômica. A ausência de centrossomos implica que a coordenação espacial e temporal dessa quinase seja mediada por mecanismos distintos daqueles observados em células somáticas, possivelmente envolvendo proteínas adaptadoras específicas do oócito e vias de sinalização sensíveis à organização dos MTOCs (BLENGINI; SCHINDLER, 2022).

Estudos recentes demonstraram que, nos oócitos, a PLK1 é ativada logo na retomada da meiose, inicialmente nos centros organizadores de microtúbulos (MTOCs) e, posteriormente, nos cinetócoros. Essa quinase é essencial para uma retomada meiótica eficiente, promovendo a quebra do envelope nuclear (GVBD) e sendo necessária para o recrutamento de proteínas centrossomais aos MTOCs acentriolares. Esses eventos favorecem a formação adequada do fuso meiótico e garantem a fixação estável dos cinetócoros aos microtúbulos (SCHUH; ELLENBERG 2007, NARULA; WIGNALL, 2025).

Diante das lacunas existentes no conhecimento, é fundamental aprofundar os estudos sobre os mecanismos de expressão, localização subcelular e ativação por fosforilação da PLK1 durante a maturação oocitária. Assim, o presente trabalho tem como objetivo analisar a dinâmica espaço-temporal da PLK1 fosforilada em Thr210 e Ser137 durante a maturação *in vitro* de oócitos de camundongos, buscando ampliar o entendimento sobre os mecanismos moleculares que regulam a progressão meiótica e a aquisição da competência oocitária.

2. REVISÃO

2.1 OOGÊNESE

A oogênese tem início durante a vida fetal e se estende até o final do período reprodutivo da fêmea. Os gametas femininos são originados a partir das células germinativas primordiais, que migram até a gônada primária, passando por sucessivas divisões mitóticas e dando origem às ovogônias. Essas células, posteriormente, diferenciam-se em oócitos primários, que iniciam a meiose, mas permanecem interrompidos na prófase I, no estágio de diplóteno, também conhecido como vesícula germinativa (GV) (NAGAOKA; HASSOLD; HUNT, 2012).

Durante o bloqueio meiótico, os oócitos passam por uma fase de crescimento, caracterizada pelo acúmulo de mRNAs, proteínas e organelas no citoplasma, elementos indispensáveis para sustentar os eventos posteriores de maturação oocitária (JAFFE; EGBERT, 2017). Apenas uma fração do total das ovogônias atinge os estágios avançados de desenvolvimento e ovulação; a maioria dos folículos primordiais remanescentes sofre apoptose (NORRIS et al., 2008).

Esse processo de formação inicial estabelece a base para a etapa seguinte, a maturação oocitária, responsável por conferir competência meiótica e potencial de fecundação ao gameta feminino.

2.2 MATURAÇÃO DE OÓCITOS EM MAMÍFEROS

A maturação oocitária em mamíferos é um processo altamente coordenado e especializado, fundamental para a geração de gametas femininos competentes para a fecundação e o desenvolvimento embrionário. Trata-se de um ciclo celular particular, no qual ocorrem duas divisões meióticas sucessivas sem a intercalação da fase S de síntese de DNA. (NAGAOKA; HASSOLD; HUNT, 2012).

O processo inicia-se no estágio de vesícula germinativa, prossegue com a quebra da vesícula germinativa (GVBD), avança para a metáfase I (MI) e culmina na metáfase II (MII). Atingir o estágio de MII é crucial, pois garante a competência do oócito para a fusão adequada com o espermatozoide durante a fecundação e para a correta reorganização cromossômica, assegurando o desenvolvimento embrionário inicial. (STRĄCZYŃSKA et al., 2022).

A retomada da meiose é induzida pelo pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH), é caracterizada pela GVBD, montagem do fuso meiótico em MI, alinhamento e segregação cromossômica, com extrusão do primeiro corpúsculo polar (COTICCHIO et al., 2015). Após a anáfase/telófase I, o oócito permanece bloqueado em MII até a fecundação (LITTLE; JORDAN, 2020; TELFER et al., 2023).

Dessa maneira, a maturação oocitária constitui uma etapa essencial para a aquisição da competência à fecundação. Esse processo não ocorre de forma isolada, mas resulta da integração de múltiplos fatores, em especial da complexa rede de sinais endócrinos e parácrinos que regulam a progressão meiótica e o desenvolvimento do ovócito.

2.2.1. Controle Hormonal da Maturação Oocitária

O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é secretado pelo hipotálamo e estimula a hipófise anterior a liberar LH e folículo estimulante (FSH). O pico de LH não apenas conclui a meiose do oócito, mas também promove a transformação do folículo. Além disso, induz a diferenciação das células da granulosa (que fornecem suporte nutricional e sinais parácrinos essenciais), e influencia as células da teca, responsáveis pela produção de hormônios sexuais femininos que circundam o oócito (CONTI et al., 2012; OWEN; JAFFE, 2012; YDING ANDERSEN, 2002).

Em protocolos experimentais, a Gonadotrofina Sérica de Égua Prenhe (PMSG), atualmente conhecida como gonadotrofina Coriônica Equina (eCG), apresenta ação semelhante à do FSH, estimulando o crescimento e desenvolvimento dos folículos ovarianos e preparando os oócitos para a ovulação. A eCG e a hCG (Gonadotrofina coriônica Humana) mimetiza o efeito indutor da ovulação do LH (BEHRINGER et al., 2018). Dessa forma, a maturação do oócito pode ser modulada por GnRH, LH, FSH, PMSG (eCG) e hCG, em conjunto com os sinais produzidos pelas células da granulosa e da teca, garantindo a aquisição de competência meiótica necessária para a fecundação.

Além da regulação hormonal, a segregação cromossômica é outro evento importante, dependente de eventos integrados, incluindo a formação de um fuso bipolar estável e a ligação adequada dos microtúbulos aos cinetócoros — estruturas proteicas localizadas nos centrômeros dos cromossomos, que atuam como

pontos de ancoragem e sensoriamento da tensão gerada pelo fuso (MULLEN et al., 2019).

O mau funcionamento desse sistema pode resultar em não-disjunção cromossômica e aneuploidia, que são as principais causas de infertilidade feminina, aborto espontâneo e doenças genéticas (BENNABI; TERRET; VERLHAC, 2016).

Esses eventos altamente coordenados no tempo e espaço, dependem de redes complexas de sinalização intracelular. Entre os reguladores moleculares mais importantes estão as proteínas quinases, que, por meio da fosforilação de alvos específicos, controlam etapas críticas da progressão meiótica, desde a ativação inicial que leva à GVBD até a estabilização do fuso e a segregação cromossômica (EPPIG, 1996).

2.3. PAPEL DAS PROTEÍNAS QUINASES NA MEIOSE

As proteínas quinases constituem uma ampla família de enzimas que catalisam a transferência de grupos fosfato, geralmente a partir do trifosfato de adenosina (ATP), para resíduos específicos de serina, treonina ou tirosina em proteínas-alvo. Esse processo, denominado fosforilação, é um dos principais mecanismos de regulação pós- traducional e modula propriedades fundamentais das proteínas, como atividade enzimática, localização subcelular, estabilidade estrutural e capacidade de interação com outros componentes celulares (MANNING et al., 2002).

Durante a meiose oocitária, a atividade coordenada de diferentes quinases é essencial para sincronizar eventos nucleares e citoplasmáticos. A Quinase dependente de ciclina 1 (CDK1), em complexo com a ciclina B, desempenha um papel central no controle da entrada e progressão meiótica, promovendo a ruptura da vesícula germinativa (GVBD) e a transição para a metáfase I (ADHIKARI; LIU, 2014). As quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) contribuem para a regulação da dinâmica do citoesqueleto e para a manutenção da estabilidade do fuso meiótico (SU et al., 2002). Por sua vez, a Polo-like kinase 1 (PLK1) atua em múltiplas etapas, incluindo a desintegração do envoltório nuclear, a montagem do fuso, a ligação adequada cinetócoro–microtúbulo e a execução dos eventos de citocinese (SONG et al., 2008; HYUN et al., 2014).

A ativação dessas quinases segue uma sequência temporal altamente controlada e interdependente, na qual a conclusão bem-sucedida de cada

fase meiótica é pré-requisito para o início da etapa seguinte. Disfunções nesse sistema, seja por inibição, hiperativação ou desregulação espacial, podem comprometer o alinhamento e a segregação cromossômica, resultando em aneuploidias e redução da competência oocitária (JONES; LANE, 2013).

Dentre essas enzimas, a PLK1 apresenta um interesse particular, pois combina funções estruturais e regulatórias essenciais para a correta progressão da meiose. Sua atividade, dependente de modificações pós-traducionais como a fosforilação em resíduos específicos, é determinante para a coordenação de múltiplos eventos celulares — desde a formação e estabilização do fuso até a conclusão da divisão.

2.4. ESTRUTURA E FUNÇÃO DA POLO-LIKE KINASE 1

A quinase semelhante a polo (Polo-Like Kinase 1; PLK1) é uma quinase serina/treonina da família de quinases semelhante à Polo (polo-like), composta por um domínio catalítico N-terminal (domínio quinase), responsável pela atividade enzimática, e um domínio regulador C-terminal, denominado domínio polo-box (PBD), que reconhece e se liga a proteínas previamente fosforiladas por outras quinases. Essa interação direciona o recrutamento da PLK1 para substratos e estruturas subcelulares específicas, garantindo a execução coordenada de suas funções (BARR; SILLJÉ; NIGG, 2004).

Durante a mitose, a PLK1 atua como regulador central da entrada na divisão celular, promovendo a maturação dos centrossomos, a ligação correta microtúbulo–cinetócoro, a condensação e segregação cromossômica e a citocinese (LANE; NIGG, 1996; LIU et al., 2012; SCHMUCKER; SUMARA, 2014; GHEGHIANI et al., 2017). Esses papéis são exercidos por meio da fosforilação de diversos alvos, incluindo proteínas estruturais do fuso e reguladores do ciclo celular (ARCHAMBAULT; GLOVER, 2009).

A regulação da PLK1 depende de fosforilações específicas em seu domínio catalítico e em outras regiões moduladoras. A fosforilação no resíduo Thr210, mediada principalmente pela Aurora A quinase em complexos com seu coativador Bora, é considerada crítica para a ativação plena da enzima, especialmente na transição G2/M (SEKI et al., 2008). Já a fosforilação no resíduo Ser137, embora menos estudada, tem sido associada à regulação fina da atividade e à modulação da

interação da PLK1 com estruturas cromossômicas, possivelmente influenciando sua localização subcelular e seu papel na estabilização da ligação cinetócoro–microtúbulo (JANG et al., 2002; LIU et al., 2012).

Apesar dos avanços no conhecimento sobre Thr210, as funções regulatórias e a dinâmica espacial da fosforilação em Ser137 permanecem pouco caracterizadas, sobretudo durante a meiose em oócitos de mamíferos. Essa lacuna reforça a importância de investigar comparativamente esses dois estados fosforilados no contexto da maturação meiótica.

2.5. FUNÇÕES DA PLK1 NA MEIOSE DE OÓCITOS

Nos oócitos de mamíferos, a PLK1 desempenha papel central na coordenação de múltiplos eventos essenciais para a maturação meiótica. Sua atuação inicia-se na quebra da vesícula germinativa (GVBD), processo no qual regula a reorganização dos poros nucleares e promove alterações no citoesqueleto que facilitam a desintegração da membrana nuclear (MARTINO et al., 2017).

Após a GVBD, a PLK1 é crucial para a organização do fuso acentriolar (característica dos oócitos) por promover a fragmentação e a posterior coalescência dos centros organizadores de microtúbulos (MTOCs) em dois polos distintos, assegurando a formação de um fuso bipolar funcional (VAN VUGT et al., 2004; CLIFT; SCHUH, 2015; SOLC et al., 2015).

Durante a metáfase I, a PLK1 participa da regulação do ponto de controle da montagem do fuso (*spindle assembly checkpoint*; SAC), estabilizando as ligações cinetócoro–microtúbulo e contribuindo para a ativação do complexo promotor da anáfase/ciclossomo (APC/C), que degrada a securina e a ciclina B, permitindo a transição para a anáfase (ZHANG et al., 2017; SUBRAMANIAN et al., 2020).

A localização subcelular da PLK1 é dinâmica ao longo da meiose: inicialmente concentrada nos centrossomos e região centromérica, transloca-se para os polos do fuso e, posteriormente, para a zona intermediária durante a citocinese, refletindo seu envolvimento funcional em cada fase (SEVERANCE; LATHAM, 2017; YUEN et al., 2023).

A regulação de sua atividade envolve modificações pós-traducionais. A fosforilação no resíduo Thr210, localizada no domínio catalítico, é determinante para a ativação plena da enzima e está associada ao controle da montagem e estabilidade

do fuso. Por outro lado, a fosforilação no resíduo Ser137, menos estudada, pode modular interações específicas com componentes do cinetócoro e microtúbulos, contribuindo para a estabilidade da ligação cinetócoro–microtúbulo e para a manutenção da estrutura do fuso durante a metáfase II (SO et al., 2019; FEITOSA et al., 2018).

2.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora os papéis gerais da PLK1 na mitose e em aspectos da meiose sejam conhecidos, ainda há lacunas importantes sobre como sua localização subcelular e estado de fosforilação variam ao longo dos estágios meióticos. Pouco se sabe, por exemplo, sobre as funções específicas de diferentes formas fosforiladas da PLK1, como pThr210 e pSer137, durante a maturação meiótica em oócitos de camundongos.

O estudo detalhado desses padrões pode esclarecer mecanismos de regulação da montagem e manutenção do fuso meiótico, da ligação cinetócoro–microtúbulo e da progressão ordenada da meiose. Além de contribuir para a compreensão básica da biologia reprodutiva, tais informações têm potencial de aplicação no aprimoramento de técnicas de reprodução assistida e no entendimento de falhas meióticas associadas à infertilidade feminina (NAGAOKA; HASSOLD; HUNT, 2012; ZHANG et al., 2017).

3. JUSTIFICATIVA

A maturação oocitária é um processo central para a reprodução em mamíferos, determinando a qualidade do gameta feminino e, conseqüentemente, o sucesso da fecundação e do desenvolvimento embrionário inicial. Apesar dos avanços no entendimento da meiose, persistem lacunas sobre as moléculas que regulam a progressão meiótica e a organização do fuso em oócitos, especialmente devido às suas características estruturais peculiares, como a ausência de centríolos e a presença de centros organizadores de microtúbulos (MTOCs) acentriolares.

A Polo-like kinase 1 (PLK1) é uma quinase serina/treonina fundamental para a divisão celular em células somáticas, desempenhando papéis essenciais na organização do fuso, segregação cromossômica e citocinese. Contudo, seu papel específico na meiose oocitária, especialmente no que tange à sua localização subcelular e ativação por fosforilação nos resíduos Thr210 e Ser137 durante a maturação do oócito, ainda é pouco compreendido.

Dada a importância da fosforilação desses resíduos para a atividade funcional da PLK1 em processos relacionados à organização do fuso e segregação cromossômica, compreender esses aspectos na meiose oocitária é imprescindível. Falhas na regulação desses mecanismos podem resultar em aneuploidias, que são responsáveis por significativa parcela da infertilidade feminina e insucesso em tratamentos de reprodução assistida.

Assim, analisar a dinâmica espaço-temporal da localização e fosforilação da PLK1 em Thr210 e Ser137 durante a maturação *in vitro* de oócitos de camundongos justifica-se pela necessidade de aprofundar o conhecimento dos mecanismos moleculares que regulam a progressão meiótica e a competência oocitária.

4. HIPÓTESE

A PLK1 apresenta padrões de localização subcelular e de fosforilação específicos e dinamicamente regulados durante a progressão meiótica de oócitos de camundongos. A fosforilação nos resíduos Thr210 e Ser137 ocorre de maneira diferencial e temporalmente coordenada, indicando funções complementares na organização do fuso meiótico, no posicionamento dos centros organizadores de microtúbulos (MTOCs) e na mediação da correta ancoragem dos cinetócoros aos microtúbulos, fatores essenciais para assegurar a segregação cromossômica fiel durante a meiose.

5. OBJETIVOS

5.3. OBJETIVO GERAL

Investigar a dinâmica espaço-temporal da localização subcelular e do estado de fosforilação da proteína quinase polo-like kinase 1 (PLK1), especificamente nos resíduos Thr210 e Ser137, durante a progressão meiótica de oócitos de camundongos maturados in vitro por períodos de 0 h, 4 h, 8 h, 10 h e 12 h.

5.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar e analisar, por imunofluorescência, a localização subcelular da PLK1 total durante a maturação oocitária.
2. Avaliar a dinâmica espaço-temporal da fosforilação da PLK1 no resíduo Thr210 ao longo da progressão meiótica.
3. Caracterizar o padrão de localização subcelular da PLK1 fosforilada no resíduo Ser137 durante a maturação oocitária.
4. Comparar os padrões de localização e a dinâmica espaço-temporal da PLK1 fosforilada nos resíduos Thr210 e Ser137, identificando similaridades e diferenças ao longo dos estágios meióticos.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. DECLARAÇÃO ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Os camundongos utilizados neste estudo foram alojados e mantidos nas instalações de Ciências Comparativas da Universidade Rockefeller, aprovadas pela Associação Americana para Acreditação do Cuidado de Animais de Laboratório. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as Diretrizes para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório estabelecidas pelo National Institutes of Health (NIH) e aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Universidade Rockefeller (protocolo RU IACUC nº 13659).

6.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para avaliar a dinâmica de localização subcelular da PLK1 fosforilada nos resíduos Thr210 e Ser137 ao longo da progressão meiótica, foram utilizadas 15 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6J (Jackson Laboratory -Bar Harbor, Maine), com idade entre 6 e 10 semanas, mantidas em biotério sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C), umidade relativa (50–60%) e fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro, com acesso *ad libitum* a água e ração comercial.

Os oócitos foram coletados e submetidos à maturação *in vitro* em meio específico, sendo distribuídos em cinco grupos experimentais, de acordo com o tempo de cultivo e o estágio de desenvolvimento meiótico: 0 horas – vesícula germinativa (GV); 4 horas – quebra da vesícula germinativa (GVBD); 8 horas – metáfase I (MI); 10 horas – anáfase/telófase; e 12 horas – metáfase II (MII). Para cada grupo experimental, foram realizadas três replicatas independentes, contendo de 20 a 30 oócitos. Os experimentos foram realizados no Center for Biomedical Research, Population Council, e os dados foram analisados e interpretados por Haidi Giuliana Leon Uscapi, discente do Curso de Biotecnologia da Universidade Federal da Integração Latino-Americana.

6.3. COLETA E MATURAÇÃO DE OÓCITOS

Os oócitos no estágio de vesícula germinativa (GV) foram coletados 42–46 horas após a injeção intraperitoneal com 5 UI de gonadotrofina coriônica de égua prenhe (PMSG; EMD Biosciences/Calbiochem). Oócitos GV com cúmulos intactos foram liberados por punção folicular ovariana em solução de lactato de Tyrode tamponada com HEPES (TL- HEPES), contendo 1 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA; Sigma-Aldrich) e 100 μ M de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX; EMD Biosciences/Calbiochem) para bloqueio da progressão espontânea da meiose. As células do cúmulo foram removidas mecanicamente por pipetagem repetida utilizando capilares de vidro de ponta fina. Os oócitos desnudos foram lavados para remoção do IBMX e submetidos à maturação *in vitro* em meio Chatot, Ziomek e Bavister (CZB; Chatot et al., 1989), suplementado com 3 mg/mL de BSA, a 36,5 °C, sob atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

6.4. IMUNOFLUORESCÊNCIA

As zonas pelúcidas foram removidas dos oócitos por tratamento breve com solução de pronase a 0,5% (Sigma, P8811). Em seguida, os oócitos livres de ZP foram lavados três vezes em solução de PBS contendo 0,1% de albumina sérica bovina (PBS–BSA) e fixados em paraformaldeído a 3,7% (Electron Microscopy Sciences, 15710) em PBS–BSA por 30 minutos. Posteriormente os oócitos foram permeabilizados com Triton X-100 a 0,1% em PBS–BSA por 5 minutos, seguida de três lavagens em PBS–BSA 0,1%.

Para o bloqueio de ligações inespecíficas, os oócitos foram incubados em PBS contendo 1% de BSA por, no mínimo, 2 horas a 4 °C, sendo posteriormente submetidos à incubação com anticorpo primário durante a noite (4 °C). Após 3 lavagens em PBS–BSA, as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário por 1 hora à temperatura ambiente. O DNA dos oócitos foi corado com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 10 µg/mL, 10 min; Sigma, D9542) e montado com DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano; Sigma, D2522) entre lâmina e lamínula de vidro (Thermo Scientific, 2960-001).

A aquisição das imagens foi realizada em microscópio de fluorescência utilizando objetiva de imersão em água de 20x e 40x

6.5. ANTICORPOS

Para as análises de imunofluorescência, foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anticorpo monoclonal de camundongo anti-PLK1 (Invitrogen/Life Technologies, 37–7000) na diluição de 1:100; anticorpo policlonal de coelho anti-PLK1 fosforilada em Ser137 (Upstate/EMD-Millipore, 07–1348) na diluição de 1:100; e anticorpo monoclonal de camundongo anti-PLK1 fosforilada (pT210) conjugado com Alexa Fluor® 488 (BD Bioscience, 558446) na diluição de 1:100. Para a detecção da tubulina, foi utilizado o anticorpo monoclonal de coelho anti- α -tubulina (Cell Signaling, 2125) na diluição de 1:200. Os anticorpos secundários de cabra (Alexa Fluor®, Life Technologies) foram utilizados nas seguintes condições: Alexa Fluor® 488 de cabra anti-IgG de camundongo (A-11017; 1:200) e Alexa Fluor® 555 de cabra anti-IgG de coelho (A-21429; 1:200–400).

7. RESULTADOS

7.1. DINÂMICA DA PLK1 TOTAL EM RELAÇÃO À α -TUBULINA DURANTE A MATURAÇÃO MEIÓTICA DOS OÓCITOS MURINOS

A localização subcelular da PLK1 e sua relação com a α -tubulina foram avaliadas por imunofluorescência indireta em oócitos de camundongos maturados in vitro e coletados nos estágios de vesícula germinativa (GV), quebra da vesícula germinativa (GVBD), metáfase I (MI), anáfase/telófase (Ana/Telo) e metáfase II (MII). A Figura 1 apresenta a dinâmica da distribuição subcelular da PLK1 ao longo da maturação meiótica.

No estágio GV, os oócitos apresentaram núcleo com cromatina condensada ao redor do nucléolo e padrão de marcação pontilhada de PLK1, predominantemente associada a regiões heterocromáticas. Não foi observada colocalização entre PLK1 e α -tubulina neste estágio, sendo a α -tubulina detectada na forma de pequenos pontos nucleares dispersos.

Após a GVBD, a PLK1 foi detectada como focos sobre os cromossomos condensados, coincidente com a marcação da α -tubulina nos polos do fuso em organização. Esses achados sugerem o envolvimento da PLK1 na organização dos centros organizadores de microtúbulos (MTOCs) citoplasmáticos, característicos de oócitos de roedores em MII, que originam os dois polos do fuso meiótico.

De forma consistente, no estágio MI, a PLK1 foi observada coincidente com a α -tubulina nos polos do fuso e concentrada na região centromérica, indicando participação no estabelecimento da ligação adequada dos cinetócoros aos microtúbulos.

Durante a anáfase e telófase, a PLK1 permaneceu associada à região centromérica próxima às cromátides, porém sua distribuição nos polos do fuso deslocou-se para a zona intermediária, padrão condizente com sua função na citocinese.

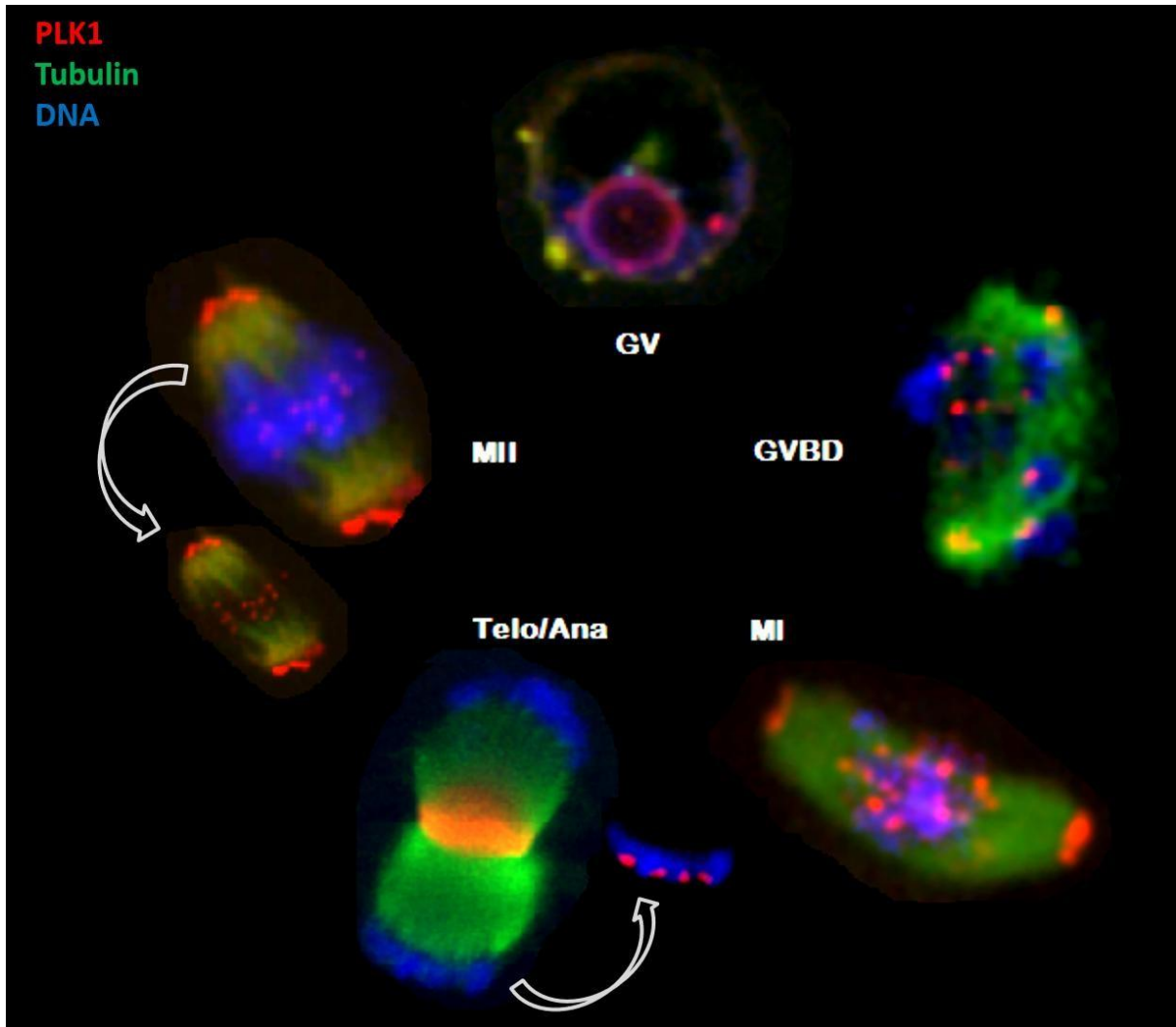


Figura 1 – Padrão da localização subcelular da PLK1 durante a maturação *in vitro*. Oócitos de camundongos foram maturados *in vitro* e coletados nos estágios de vesícula germinativa (GV, 0 h), quebra da vesícula germinativa (GVBD, 4 h), metáfase I (MI, 8 h), anáfase/telófase (Ana/Telo, 10h) e metáfase II (MII, 12 h). A PLK1 (coloração vermelha) e a alfa-tubulina (coloração verde) foram avaliadas por imunofluorescência com anticorpos específicos e o DNA foi marcado com DAPI (coloração azul).
Fonte: Autor

Em MII, a PLK1 voltou a ser detectada nos polos do fuso, reforçando a hipótese de sua atuação no estabelecimento de um fuso bipolar. Nesse estágio, também foi observada marcação de PLK1 na região centromérica, coincidente com o sinal de α -tubulina, o que sugere participação na ligação adequada dos cromossomos aos microtúbulos do fuso meiótico.

7.2. DINÂMICA DA PLK1 FOSFORILADA NO RESÍDUO THR210 DURANTE A MATURAÇÃO MEIÓTICA DOS OÓCITOS MURINOS

A localização subcelular da PLK1 fosforilada no resíduo treonina 210 (Thr210) foi avaliada por imunofluorescência indireta em oócitos de camundongos coletados após 0 h (GV), 4 h (GVBD), 8 h (MI), 10 h (Ana/Telo) e 12 h (MII) de maturação *in vitro*. A Figura 2 ilustra a distribuição dinâmica dessa forma ativa da PLK1 ao longo das diferentes fases da meiose.

No estágio GV, a PLK1 fosforilada em Thr210 apresentou padrão pontilhado predominante em regiões heterocromáticas no núcleo, sem colocalização evidente com microtúbulos, refletindo um estado pré-ativação compatível com o bloqueio meiótico característico dessa fase.

Com a GVBD, observou-se redistribuição marcante da PLK1 fosforilada, que passou a localizar-se nos polos do fuso meiótico, na região centromérica dos cromossomos e, adicionalmente, ao longo de toda a extensão do fuso. Essa ampla marcação sugere que a ativação em Thr210 está associada não apenas ao controle dos polos, mas também à organização e estabilização dos microtúbulos durante a montagem do fuso bipolar.

Durante a MI, esse padrão foi mantido, com forte sinal nos polos e nos centrômeros, indicando participação contínua na ancoragem cinetócoro–microtúbulo e na manutenção da integridade estrutural do fuso.

Na anáfase/telófase, a marcação nos polos diminuiu, com deslocamento gradual para a zona intermediária, mantendo-se presente nos centrômeros. Essa translocação é compatível com o envolvimento da PLK1 fosforilada em Thr210 na reorganização do citoesqueleto e nos eventos iniciais da citocinese.

Por fim, na MII, a PLK1 fosforilada em Thr210 voltou a se concentrar principalmente nos polos e nos centrômeros, apresentando localização no fuso meiótico (microtúbulos) e sinal coincidente com cromatina marcada por DAPI. Esse padrão reforça seu papel essencial na estabilização do fuso e na preparação do oócito para a segunda divisão meiótica.

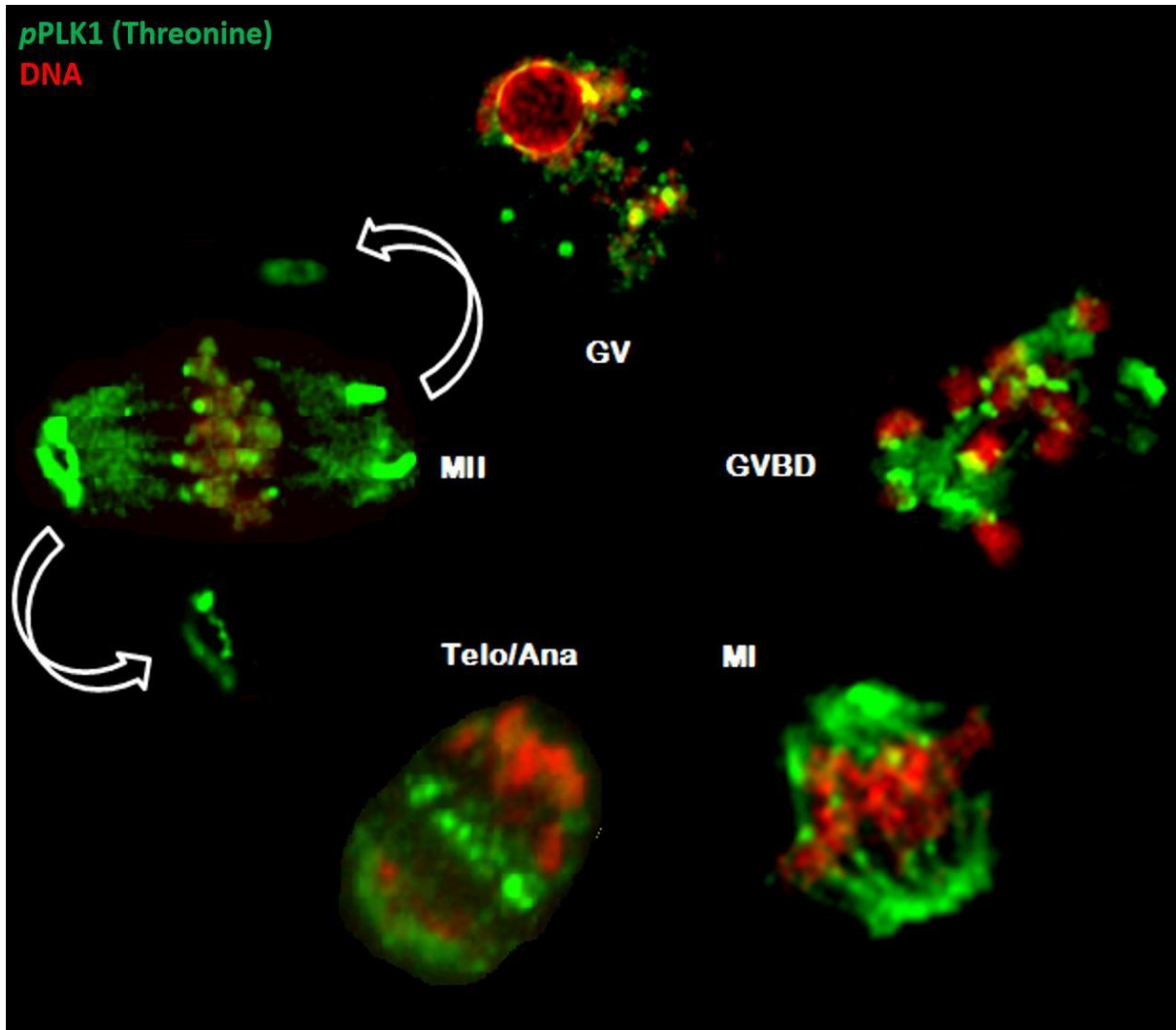


Figura 2 – Distribuição subcelular da PLK1 fosforilada em Thr210 durante a maturação meiótica de oócitos de camundongos. Oócitos foram maturados *in vitro* e avaliados nos estágios de vesícula germinativa (GV, 0 h), quebra da vesícula germinativa (GVBD, 4 h), metáfase I (MI, 8 h), anáfase/telófase I (Ana/Telo, 10 h) e metáfase II (MII, 12 h). A PLK1 fosforilada no resíduo Thr210 (pThr210-PLK1) foi detectada por imunofluorescência indireta (coloração verde) com anticorpo específico. O DNA foi corado com DAPI (coloração vermelha). Fonte: Autor

7.3. DINÂMICA DA PLK1 FOSFORILADA NO RESÍDUO SER137 DURANTE A MATURAÇÃO MEIÓTICA DOS OÓCITOS MURINOS

A localização subcelular da PLK1 fosforilada no resíduo serina 137 (Ser137) foi analisada por imunofluorescência indireta em oócitos de camundongos nos estágios de vesícula germinativa (GV), quebra da vesícula germinativa (GVBD), metáfase I (MI), anáfase/telófase e metáfase II (MII). A Figura 3 ilustra a distribuição espaço-temporal dessa forma fosforilada ao longo da maturação meiótica.

No estágio GV, o sinal apresentou-se como pequenos focos nucleares, predominantemente em regiões heterocromáticas adjacentes ao nucléolo, sem marcação citoplasmática detectável.

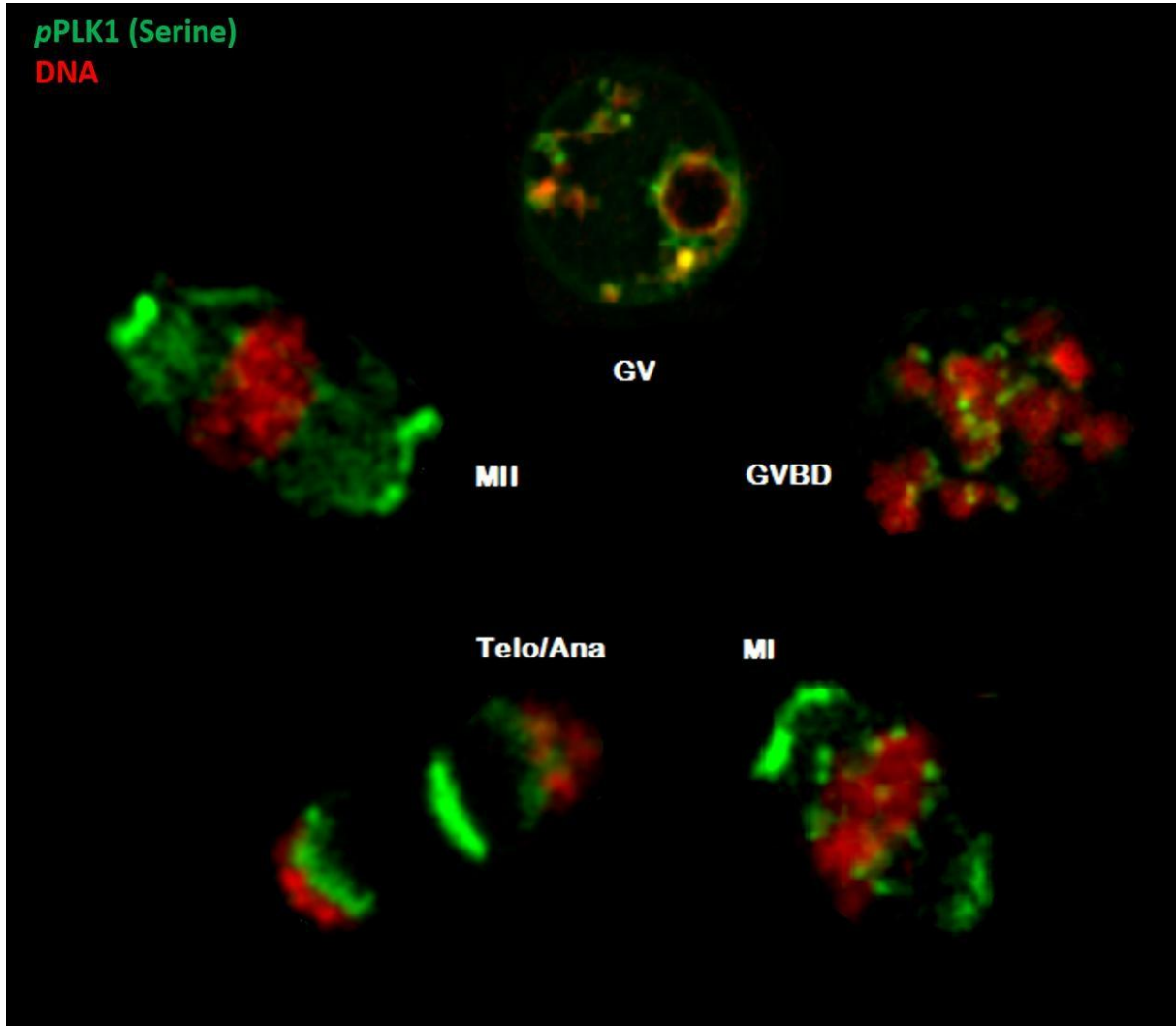


Figura 3 – Dinâmica subcelular da PLK1 fosforilada em Ser137 durante a maturação *in vitro* de oócitos de camundongos. Oócitos foram maturados *in vitro* e coletados nos estágios de vesícula germinativa (GV, 0 h), quebra da vesícula germinativa (GVBD, 4 h), metáfase I (MI, 8 h), anáfase/telófase I (Ana/Telo, 10 h) e metáfase II (MII, 12 h). A PLK1 fosforilada no resíduo Ser137 (pSer137-PLK1) foi detectada por imunofluorescência indireta (coloração verde) utilizando anticorpo específico, enquanto o DNA foi corado com DAPI (coloração vermelha). Fonte: Autor

Após a GVBD, a PLK1 fosforilada em Ser137 concentrou-se nos polos do fuso meiótico em formação e na região centromérica dos cromossomos, permanecendo ausente na porção central do fuso. Esse padrão foi preservado em MI, com intensa presença nos polos e centrômeros, sugerindo um papel regulador na ligação cinetócoro–microtúbulo e na organização dos polos do fuso.

Durante a anáfase e telófase, o sinal nos polos reduziu-se progressivamente, enquanto a marcação centromérica foi mantida, acompanhada de redistribuição para a zona intermediária, padrão compatível com funções na transição meiótica e na citocinese.

Na metáfase II, a PLK1 fosforilada em Ser137 voltou a apresentar forte marcação nos polos e centrômeros, mas também passou a ser detectada ao longo do fuso meiótico, indicando possível envolvimento na manutenção e estabilidade do fuso bipolar plenamente estabelecido, etapa essencial para a correta segregação cromossômica na segunda divisão meiótica.

7.4. INTEGRAÇÃO DOS RESULTADOS

A comparação da distribuição subcelular da PLK1 total e de suas formas fosforiladas nos resíduos Thr210 e Ser137 revelou padrões gerais semelhantes ao longo da maturação meiótica, mas com diferenças que indicam papéis regulatórios distintos e complementares para cada estado de fosforilação.

No estágio de vesícula germinativa (GV), todas as formas apresentaram marcação nuclear pontilhada, concentrada em regiões heterocromáticas adjacentes ao nucléolo, sem sinal aparente no citoplasma. Após a quebra da vesícula germinativa (GVBD), a PLK1 total e a pSer137 localizaram-se predominantemente nos polos do fuso e nos centrômeros, enquanto a pThr210, além dessas regiões, apresentou distribuição contínua ao longo dos microtúbulos do fuso, sugerindo envolvimento direto na montagem e estabilização dessa estrutura.

Durante a metáfase I (MI), manteve-se essa diferenciação, com a pThr210 preservando a marcação sobre o fuso e as demais formas restritas a polos e centrômeros. Na anáfase/telófase, todas as variantes mantiveram o sinal centromérico, reduziram a marcação nos polos e redistribuíram-se para a zona intermediária (*mid-zone*), padrão compatível com funções na reorganização do fuso e na citocinese.

Na metáfase II (MII), observou-se convergência parcial: PLK1 total e pSer137 exibiram marcação também ao longo do fuso, padrão semelhante ao da pThr210, sugerindo atuação cooperativa na estabilização do fuso bipolar já estabelecido. A pThr210, entretanto, manteve seu padrão característico desde a GVBD, reforçando seu papel contínuo na organização e na estabilidade dos microtúbulos durante todo o processo meiótico.

Em conjunto, os resultados indicam que a fosforilação da PLK1 em Thr210 está mais diretamente associada à montagem e estabilidade estrutural do fuso, enquanto a fosforilação em Ser137 parece estar relacionada à regulação da interação cinetócoro–microtúbulo e à manutenção dos polos, especialmente nas etapas iniciais da maturação e posteriormente na estabilidade do fuso na MII.

8. DISCUSSÃO

A Polo-like kinase 1 (PLK1) é uma quinase serina/treonina que desempenha papéis fundamentais em múltiplos processos do ciclo celular, incluindo a entrada na mitose/meiose, maturação do centríolo, condensação cromossômica, montagem do fuso mitótico/meiótico e citocinese (ABE et al., 2011; KAGAMI et al., 2017). Apesar do conhecimento avançado sobre a função da PLK1 em mitose, sua regulação e papel durante a meiose, especialmente na transição da meiose I (MI) para meiose II (MII) em oócitos, são menos compreendidos. Os dados obtidos em diferentes modelos, incluindo oócitos murinos, porcinos e em estudos *in vitro*, têm fornecido evidências fundamentais para esclarecer a dinâmica e funções específicas da PLK1 durante a maturação meiótica (FEITOSA et al., 2018).

Nos oócitos, a retomada da meiose é caracterizada pela desintegração da membrana nuclear (GVBD) e pela condensação cromossômica, eventos que dependem de uma regulação precisa da atividade de múltiplas quinases, incluindo a PLK1 (SOLC et al., 2015; ZHANG et al., 2017). A análise da dinâmica da PLK1 total e suas formas fosforiladas em Thr210 e Ser137 evidencia um padrão temporal e espacial distinto durante as fases da meiose, com a PLK1 fosforilada acumulando-se no cinetócoro, polos do fuso e regiões do LISD (liquid-like meiotic spindle domain), sugerindo que a regulação pós-traducional da PLK1 é crucial para o seu correto recrutamento e função (FEITOSA et al., 2018; SO et al., 2019).

Os resultados obtidos sustentam a hipótese de que a fosforilação da PLK1 no resíduo Thr210 ocorre de forma mais pronunciada nos polos do fuso durante as fases de organização e estabilização do fuso meiótico (GVBD e MI), desempenhando papel predominante na regulação da dinâmica dos microtúbulos e na formação do fuso bipolar funcional. Essa modificação, associada ao padrão de distribuição ao longo da rede microtubular, sugere um envolvimento direto na montagem estrutural do fuso e na manutenção de sua integridade ao longo da meiose.

Por outro lado, a fosforilação no resíduo Ser137 apresentou padrão de localização diferenciado, com maior associação à região centromérica ao longo da meiose, indicando participação mais direta na estabilização da ligação cinetócoro-microtúbulo e na garantia da correta segregação cromossômica. Essa localização restrita aos polos e centrômeros, exceto em MII, onde também é observada na região do fuso, reforça a ideia de que a Ser137 atua de forma complementar ao Thr210, exercendo função regulatória mais focalizada, mas igualmente indispensável para a fidelidade da divisão celular.

Diferentemente das células somáticas, que possuem centríolos, os oócitos de mamíferos formam fusos meióticos acentriolares, dependentes da fragmentação e reagrupamento dos centros organizadores de microtúbulos (MTOCs), processo no qual a PLK1 exerce papel essencial. A PLK1 é requerida para a dissociação de C-NAP1 dos MTOCs, possibilitando sua fragmentação e a subsequente formação do fuso bipolar funcional (CLIFT; SCHUH, 2015; FEITOSA et al., 2018). A ausência ou inibição da PLK1, demonstrada tanto por mutação condicional quanto por inibidores farmacológicos como BI2536 e GSK461364, resulta em fusos malformados, com ausência de proteínas essenciais como gamma-tubulina, CEP192 e NEDD1 nos MTOCs, culminando em falha da segregação cromossômica (SOLC et al., 2015; ZHANG et al., 2017).

A formação adequada do fuso é pré-requisito para o estabelecimento das ligações cinetócoro-microtúbulo estáveis, que são monitoradas pelo checkpoint do fuso (SAC). A PLK1 regula essa ligação direta e indiretamente, estabilizando os microtúbulos nos cinetócoros e promovendo a satisfação do SAC, liberando a anáfase (SOLC et al., 2015; CLIFT; SCHUH, 2015), onde a inibição da PLK1 não alterou a montagem inicial do fuso, mas comprometeu a segregação cromossômica, resultando em bloqueio no estágio de anáfase I e falha na extrusão do primeiro corpúsculo polar, sugerindo uma função crítica da PLK1 na manutenção da estabilidade cinetócoro-

microtúbulo e na ativação do APC/C (SUN et al., 2012; WHITFIELD et al., 2013; ZHANG et al., 2017; BRAUN et al., 2021).

Além disso, a PLK1 está implicada na regulação da ativação do APC/C, promovendo a degradação de inibidores como EMI1, o que permite a degradação subsequente de securina e ciclina B, essenciais para o avanço da meiose (Hansen et al., 2004; Jia et al., 2016). Diferentemente do que ocorre em células somáticas, onde a simples abolição do SAC pode permitir a entrada na anáfase mesmo na ausência de PLK1, nos oócitos a atividade plena da PLK1 é indispensável para a ativação do APC/C e progressão da meiose, possivelmente devido ao maior volume celular e à necessidade de degradação eficiente de maiores quantidades de substratos (SUN et al., 2012; WHITFIELD et al., 2013; BRAUN et al., 2021).

Outro aspecto relevante é o papel da PLK1 na manutenção da condensação cromossômica durante a transição MI-MII. Nossos dados de localização subcelular corroboram com a hipótese que a PLK1 contribui para manter o estado condensado dos cromossomos, prevenindo sua descondensação prematura, provavelmente via manutenção da atividade do complexo CDK1-ciclina B (FEITOSA et al., 2018; ZHANG et al., 2017), fundamental para a qualidade dos oócitos maduros.

Em síntese, a dinâmica diferenciada da fosforilação em Thr210 e Ser137 demonstra que essas modificações pós-traducionais não são redundantes, mas complementares, e que ambas são indispensáveis para a coordenação dos eventos que asseguram a montagem e estabilidade do fuso meiótico, a correta segregação cromossômica e a progressão ordenada da meiose. Tais mecanismos evidenciam a importância da PLK1 como um regulador multifuncional e essencial para a fidelidade meiótica e a competência do oócito.

9. CONCLUSÃO

Este estudo fornece evidências de que a fosforilação da PLK1 nos resíduos Thr210 e Ser137 é diferencialmente regulada durante a meiose de oócitos murinos, refletindo papéis complementares na montagem, manutenção e reorganização do fuso meiótico. Enquanto a pThr210 mostra-se envolvida desde etapas iniciais até a estabilidade fusorial contínua, a pSer137 desempenha função mais restrita ao início e manutenção tardia deste processo, ressaltando a complexidade regulatória da PLK1 na maturação oocitária.

REFERÊNCIAS

- ABE, S.; NAGASAKA, K.; HIRAYAMA, Y.; KOZUKA-HATA, H.; OYAMA, M.; AOYAGI, Y.; OBUSE, C.; HIROTA, T. The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes & Development*, v. 25, n. 8, p. 863-874, 2011. doi: <https://doi.org/10.1101/gad.2016411>
- ADHIKARI, D.; LIU, K. The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 382, n. 1, p. 480-487, 2014. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.07.027>
- ARCHAMBAULT, V.; GLOVER, D. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 10, p. 265-275, 2009. doi: <https://doi.org/10.1038/nrm2653>
- BARR, F.; SILLJÉ, H.; NIGG, E. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 5, p. 429-441, 2004. doi: <https://doi.org/10.1038/nrm1401>
- BATY, P.; GERLICH, D. W. Mitotic chromosome mechanics: How cells segregate their genome. *Trends in Cell Biology*, v. 29, n. 9, p. 717-726, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.05.007>
- BENNABI, I.; TERRET, M. E.; VERLHAC, M. H. Meiotic spindle assembly and chromosome segregation in oocytes. *Journal of Cell Biology*, v. 215, n. 5, p. 611-619, 2016. doi: <https://doi.org/10.1083/jcb.201607062>
- BEHRINGER, R.; GERTSENSTEIN, M.; VINTERSTEN NAGY, K.; NAGY, A. Administration of Gonadotropins for Superovulation in Mice. *Cold Spring Harbor Protocols*, v. 2018, n. 1, p. pdb.prot092403, 2018. doi: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot092403>.
- BERGERO, R.; ELLIS, P.; HAERTY, W.; LARCOMBE, L.; MACAULAY, I.; MEHTA, T.; MOGENSEN, M.; MURRAY, D.; NASH, W.; NEALE, M. J.; O'CONNOR, R.; OTTOLINI, C.; PEEL, N.; RAMSEY, L.; SKINNER, B.; SUH, A.; SUMMERS, M.; SUN, Y.; TIDY, A.; RAHBARI, R.; RATHJE, C.; IMMLER, S. Meiosis and beyond - understanding the mechanistic and evolutionary processes shaping the germline genome. *Biological Reviews*, v. 96, n. 3, p. 822-841, 2021. doi: <https://doi.org/10.1111/brv.12680>
- BLENGINI, C. S.; SCHINDLER, K. Acentriolar spindle assembly in mammalian female meiosis and the consequences of its perturbations on human reproduction. *Biology of Reproduction*, v. 106, n. 2, p. 253-263, 2022. doi: <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab210>
- BRAUN, A. L.; MEGHINI, F.; VILLA-FOMBUENA, G.; GUERMONT, M.; FERNANDEZ-MARTINEZ, E.; QIAN, Z.; MARTIN-BERMUDO, M. D.; GONZÁLEZ-REYES, A.; GLOVER, D. M.; KIMATA, Y. The careful control of Polo kinase by

APC/C-Ube2C ensures the intercellular transport of germline centrosomes during *Drosophila* oogenesis. *Open Biology*, v. 11, n. 6, 200371, 2021. doi: <https://doi.org/10.1098/rsob.200371>

CHMÁTAL, L.; YANG, K.; SCHULTZ, R. M.; LAMPSON, M. A. Spatial regulation of kinetochore microtubule attachments by destabilization at spindle poles in meiosis I. *Current Biology*, v. 25, n. 14, p. 1835-1841, 2015. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.05.013>

CLIFT, D.; SCHUH, M. A three-step MTOC fragmentation mechanism facilitates bipolar spindle assembly in mouse oocytes. *Nature Communications*, v. 6, 7217, 2015. doi: <https://doi.org/10.1038/ncomms8217>

CONTI, M.; HSIEH, M.; ZAMAH, A.M.; OH, J.S. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 356, p. 65-73., 2012. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.11.002>.

COTICCHIO, G.; DAL CANTO, M.; MIGNINI RENZINI, M.; GUGLIELMO, M. C.; BRAMBILLASCA, F.; TURCHI, D.; NOVARA, P. V.; FADINI, R. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Human Reproduction Update*, v. 21, n. 4, p. 427-454, 2015. doi: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv011>

EPPIG, J. J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 8, n. 4, p. 485-489, 1996. doi: <https://doi.org/10.1071/RD9960485>

FEITOSA, W. B.; HWANG, K.; MORRIS, P. L. Temporal and SUMO-specific SUMOylation contribute to the dynamics of Polo-like kinase 1 (PLK1) and spindle integrity during mouse oocyte meiosis. *Developmental Biology*, v. 434, p. 278-291, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.12.011>

GOLSTYN, R. M.; MUNDT, K. E.; FRY, A. M.; NIGG, E. A. Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. *Journal of Cell Biology*, v. 129, n. 6, p. 1617-1628, 1995. doi: <https://doi.org/10.1083/jcb.129.6.1617>

GHEGHIANI, M.; et al. PLK1 activation in late G2 sets up commitment to mitosis. *Cell Reports*, v. 19, n. 10, p. 2060-2073, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.031>

HANSEN, D. V.; LOKTEV, A. V.; BAN, K. H.; JACKSON, P. K. Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC inhibitor Emi1. *Molecular Biology of the Cell*, v. 15, n. 12, p. 5623-5634, 2004. doi: <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-07-0598>

HASSOLD, T.; HUNT, P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics*, v. 2, n. 4, p. 280-291, 2001. doi: <https://doi.org/10.1038/35066065>

HYUN, S. Y.; HWANG, H. I.; JANG, Y. J. Polo-like kinase-1 in DNA damage response. *BMB Reports*, v. 47, n. 5, p. 249-255, 2014. doi: <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2014.47.5.061>

JAFFE, L. A.; EGBERT, J. R. Regulation of Mammalian Oocyte Meiosis by Intercellular Communication Within the Ovarian Follicle. *Annual Review of Physiology*, v. 79, p. 237-260, 2017. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034102>

JANG, Y. J.; MA, S.; TERADA, Y.; ERIKSON, R. L. Phosphorylation of threonine 210 and the role of serine 137 in the regulation of mammalian polo-like kinase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 46, p. 44115-44120, 2002. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M202172200>

JIA, L.; LI, B.; YU, H. The Bub1–Plk1 kinase complex promotes spindle checkpoint signalling through Cdc20 phosphorylation. *Nature Communications*, v. 7, 10818, 2016. doi: <https://doi.org/10.1038/ncomms10818>

JONES, K. T.; LANE, S. I. Molecular causes of aneuploidy in mammalian eggs. *Development*, v. 140, n. 18, p. 3719-3730, 2013. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.090589>

KAGAMI, Y.; ONO, M.; YOSHIDA, K. Plk1 phosphorylation of CAP-H2 triggers chromosome condensation by condensin II at the early phase of mitosis. *Scientific Reports*, v. 7, 5583, 2017. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05986-7>

LANE, H. A.; NIGG, E. A. Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *Journal of Cell Biology*, v. 135, n. 6, p. 1701-1713, 1996. doi: <https://doi.org/10.1083/jcb.135.6.1701>

LAMB, N. E.; SHERMAN, S. L.; HASSOLD, T. J. Effect of meiotic recombination on the production of aneuploid gametes in humans. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 111, n. 3-4, p. 250-255, 2005. doi: <https://doi.org/10.1159/000086896>

LITTLE, T. M.; JORDAN, P. W. PLK1 is required for chromosome compaction and microtubule organization in mouse oocytes. *Molecular Biology of the Cell*, v. 31, n. 12, p. 1206-1217, 2020. doi: <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-12-0701>

LIU, D.; DAVYDENKO, O.; LAMPSON, M. A. Polo-like kinase-1 regulates kinetochore-microtubule dynamics and spindle checkpoint silencing. *Journal of Cell Biology*, v. 198, n. 4, p. 491-499, 2012. doi: <https://doi.org/10.1083/jcb.201205090>

MANNING, G.; WHYTE, D. B.; MARTINEZ, R.; HUNTER, T.; SUDARSANAM, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, v. 298, n. 5600, p. 1912-1934, 2002. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1075762>

MARTINO, L.; MORCHOISNE-BOLHY, S.; CHEERAMBATHUR, D. K.; VAN HOVE, L.; DUMONT, J.; JOLY, N.; DESAI, A.; DOYE, V.; PINTARD, L. Channel nucleoporins recruit PLK-1 to nuclear pore complexes to direct nuclear envelope

breakdown in *C. elegans*. *Developmental Cell*, v. 43, n. 2, p. 157-171.e7, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.09.019>

MULLEN, T. J.; DAVIS-ROCA, A. C.; WIGNALL, S. M. Spindle assembly and chromosome dynamics during oocyte meiosis. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 60, p. 53-59, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.03.014>

NAGAOKA, S. I.; HASSOLD, T. J.; HUNT, P. A. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nature Reviews Genetics*, v. 13, n. 7, p. 493-504, 2012. doi: <https://doi.org/10.1038/nrg3245>

NORRIS, R.P.; FREUDZON, M.; MEHLMANN, L.M.; COWAN, A.E.; SIMON, A.M.; PAUL, D.L.; LAMPE, P.D.; JAFFE, L.A. Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development*, v. 135, n. 19, p. 3229-3238, 2008. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.025494>

OHKURA, H. Meiosis: an overview of key differences from mitosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 7, n. 5, a015859, 2015. doi: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015859>

OWEN, C.M.; JAFFE, L.A. Luteinizing hormone-induced changes in the structure of mammalian preovulatory follicles. *Current Topics in Developmental Biology*, v. 162, p. 259-282, 2012. doi: <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2024.10.011>.

QIAN, J.; GARCÍA-GIMENO, M. A.; BEULLENS, M.; MANZIONE, M. G.; VAN DER HOEVEN, G.; IGUAL, J. C.; HEREDIA, M.; SANZ, P.; GELENS, L.; BOLLEN, M. An attachment-independent biochemical timer of the spindle assembly checkpoint. *Molecular Cell*, v. 68, n. 4, p. 715-730.e5, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.011>

SCHMUCKER, S.; SUMARA, I. Molecular dynamics of PLK1 during mitosis. *Molecular & Cellular Oncology*, v. 1, n. 2, e954507, 2014. doi: <https://doi.org/10.1080/23723548.2014.954507>

SCHUH, M.; ELLENBERG, J. Self-organization of MTOCs replaces centrosome function during acentrosomal spindle assembly in live mouse oocytes. *Cell*, v. 130, n. 3, p. 484-498, 2007. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.025>

SEVERANCE, A. L.; LATHAM, K. E. PLK1 regulates spindle association of phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein and spindle function in mouse oocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 313, n. 5, p. C501-C515, 2017. doi: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00075.2017>

SHOMPER, M.; LAPPA, C.; FITZHARRIS, G. Kinetochore microtubule establishment is defective in oocytes from aged mice. *Cell Cycle*, v. 13, n. 7, p. 1171-1179, 2014. doi: <https://doi.org/10.4161/cc.28046>

SO, C.; et al. A liquid-like spindle domain promotes acentrosomal spindle assembly in mammalian oocytes. *Science*, v. 364, n. 6443, eaat9557, 2019. doi: <https://doi.org/10.1126/science.aat9557>

SONG, M. H.; MILIARAS, N. B.; PEEL, N.; O'CONNELL, K. F. Centrioles: some self-assembly required. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 20, n. 6, p. 688-693, 2008. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.09.001>

STRĄCZYŃSKA, P.; PAPIS, K.; MORA-WIEC, E.; CZERWIŃSKI, M.; OLEJEK, A.; BEDNARSKA-CZERWIŃSKA, A. Signaling mechanisms and their regulation during in vivo or in vitro maturation of mammalian oocytes. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 20, n. 1, p. 37, 2022. doi: <https://doi.org/10.1186/s12958-022-00889-3>

SUN, S. C.; LIU, H. L.; SUN, Q. Y. Survivin regulates Plk1 localization to kinetochore in mouse oocyte meiosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 421, n. 4, p. 797-800, 2012. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.089>

SUBRAMANIAN, G. N.; GREANEY, J.; WEI, Z.; BECHEREL, O.; LAVIN, M.; HOMER, H. A. Oocytes mount a noncanonical DNA damage response involving APC-Cdh1-mediated proteolysis. *Journal of Cell Biology*, v. 219, n. 4, e201907213, 2020. doi: <https://doi.org/10.1083/jcb.201907213>

TAKAOKA, M.; SAITO, H.; TAKENAKA, K.; MIKI, Y.; NAKANISHI, A. BRCA2 phosphorylated by PLK1 moves to the midbody to regulate cytokinesis mediated by nonmuscle myosin IIC. *Cancer Research*, v. 74, n. 5, p. 1518-1528, 2014. doi: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0504>

TELFER, E. E.; GROSBOIS, J.; ODEY, Y. L.; ROSARIO, R.; ANDERSON, R. A. Making a good egg: human oocyte health, aging, and in vitro development. *Physiological Reviews*, v. 103, n. 4, p. 2623-2677, 2023. doi: <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2022>

TONG, C.; FAN, H. Y.; LIAN, L.; LI, S. W.; CHEN, D. Y.; SCHATTEN, H.; SUN, Q. Y. Polo-like kinase-1 is a pivotal regulator of microtubule assembly during mouse oocyte meiotic maturation, fertilization, and early embryonic mitosis. *Biology of Reproduction*, v. 67, n. 2, p. 546-554, 2002. doi: <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.2.546>

VAN VUGT, M. A.; VAN DE WEERDT, B. C.; VADER, G.; JANSSEN, H.; CALAFAT, J.; KLOMPMAKER, R.; WOLTHUIS, R. M.; MEDEMA, R. H. Polo-like kinase-1 is required for bipolar spindle formation but is dispensable for anaphase promoting complex/Cdc20 activation and initiation of cytokinesis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 35, p. 36841-36854, 2004. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M313681200>

WHITFIELD, Z. J.; CHISHOLM, J.; HAWLEY, R. S.; ORR-WEAVER, T. L. A meiosis-specific form of the APC/C promotes the oocyte-to-embryo transition by decreasing levels of the Polo kinase inhibitor matrimony. *PLoS Biology*, v. 11, n. 9, e1001648, 2013. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001648>

WIANNY, F.; TAVARES, A.; EVANS, M. J.; GLOVER, D. M.; ZERNICKA-GOETZ, M. Mouse polo-like kinase 1 associates with the acentriolar spindle poles, meiotic chromosomes and spindle midzone during oocyte maturation. *Chromosoma*, v. 107, n. 6-7, p. 430-439, 1998. doi: <https://doi.org/10.1007/s004120050327>

YDING ANDERSEN, C.; HUMAIDAN, P.; EJDRUP BREDKJÆR, H.; BUNGUM, L.; GRØNDAHL, M. L.; WESTERGAARD, L. G. Hormonal characteristics of follicular fluid from women receiving either GnRH agonist or hCG for ovulation induction. *Human Reproduction*, v. 21, p. 2126-2130, 2006. doi: <https://10.1093/humrep/del119>

YUEN, W. S.; ZHANG, Q. H.; BOURDAIS, A.; ADHIKARI, D.; HALET, G.; CARROLL, J. Polo-like kinase 1 promotes Cdc42-induced actin polymerization for asymmetric division in oocytes. *Open Biology*, v. 13, n. 3, 220326, 2023. doi: <https://doi.org/10.1098/rsob.220326>

ZHANG, Z.; CHEN, C.; MA, L.; et al. Plk1 is essential for proper chromosome segregation during meiosis I/meiosis II transition in pig oocytes. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 15, 69, 2017. doi: <https://doi.org/10.1186/s12958-017-0289-7>

.